UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

SANDRA SATIKO MATSUDA

**EFEITO DIFERENCIAL DO FLÚOR DURANTE A MINERALIZAÇÃO
DE OSTEÓBLASTOS DE DUAS ESPÉCIES DE CAMUNDONGOS
COM DIFERENTES DENSIDADES ÓSSEAS**

BAURU
2010

SANDRA SATIKO MATSUDA

**EFEITO DIFERENCIAL DO FLÚOR DURANTE A MINERALIZAÇÃO
DE OSTEÓBLASTOS DE DUAS ESPÉCIES DE CAMUNDONGOS
COM DIFERENTES DENSIDADES ÓSSEAS**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de
Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Biologia Oral
Orientador: Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues

BAURU
2010

M429e Matsuda, Sandra S
 Efeito diferencial do flúor durante a
 mineralização de osteoblastos de duas espécies de
 camundongos com diferentes densidades ósseas /
 Sandra Satiko Matsuda. – Bauru, 2010.
 138 p. : il. ; 31cm.

 Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia
 de Bauru. Universidade de São Paulo

 Orientador: Prof. Dr. Antonio de Castro
 Rodrigues

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução parcial desta tese, por processos fotocopiadores e
outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 21/2008
Data: 19/10/08

DEDICATÓRIA

A Deus,

Por colocar muitos anjos em meu caminho.

A minha mãe Tsunemi e meu irmão Yukinobu,

Por acreditar em mim, pelo apoio em todas as fases da minha vida, sem o qual nada seria possível.

A grande amiga Thelma,

Por estar ao meu lado quando eu mais precisei, pelas intermináveis horas no laboratório, pelas alegrias e vitórias compartilhadas.

Aos queridos amigos,

Pela amizade e companheirismo divididos durante esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

*A minha mãe **Tsunemi Tadokoro**, que me permitiu sonhar e mais importante ainda, lutar por esse sonho. Por confiar na formação que me deu, e por sempre acreditar na minha conduta. Imprescindível, em todas as etapas da minha vida, sem você eu nunca teria cumprido esta meta.*

*Ao meu irmão **Yukinobu Matsuda**, por acreditar em meus princípios, pelo apoio incondicional em todos os momentos. Por permitir que eu continuasse nessa batalha, e ajudar-me nas minhas conquistas. Pela sua cumplicidade e pela tranquilidade que me proporcionou para que eu pudesse me dedicar a esta tarefa.*

*A querida amiga **Thelma Lopes da Silva**, pela amizade mais pura e sincera que um ser humano pode almejar.*

*Ao estimado **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira**, meu co-orientador e orientador de bancada, por abrir as portas e não permitir que a minha história ficasse sem um final. Você foi fundamental para meu desenvolvimento profissional e pessoal, permitindo que eu me estabelecesse com firmeza diante as agruras da vida. Possibilitou a liberdade de raciocínio e execução, confiando na minha capacidade em realizar o trabalho proposto. Neste momento de progresso profissional, sou extremamente grata por você não medir esforços para sempre viabilizar meu aprendizado e por colaborar imensamente para a realização deste grande sonho.*

*Ao querido **Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues**, meu orientador acadêmico, que me recebeu de braços abertos, com seu jeito tão carinhoso, me ajudou a recuperar o fôlego, com seus ensinamentos e estórias cheias de lições para toda vida, acalmando meu coração e me dando forças para prosseguir em mais um dia. Obrigada por sempre me ajudar nos momentos mais críticos, e por proporcionar a realização deste sonho!*

*À amada **Cândida Erlete Giansanti**, por suas lições de vida, por compartilhar sua experiência, pelo prazer em viver, e por todo tipo de apoio que sempre me ajudou a vencer os obstáculos.*

*A **Dra. Juliana Gregório Colozzo**, pela amizade e pureza de coração que tanto tem a ensinar. Pelos preciosos momentos compartilhados, onde você era a única pessoa verdadeira com quem eu podia contar, um exemplo de honestidade e seriedade.*

*À **Dra. Taís Martins Lima**, pelas inesquecíveis lições de otimismo, pelos cuidados nos momentos mais difíceis, exemplo de pesquisadora que valoriza o ser humano, e por todo aprendizado no FACS!*

*Ao **Ovídio Santos Sobrinho**, pela disponibilidade em sempre colaborar e a ajudar a chegar às soluções que só você poderia encontrar.*

*Á **Dra. Camila Peres Buzalaf**, pelo companheirismo estabelecido em nosso grupo de pesquisa e pelas discussões e enriquecimento deste trabalho.*

*Ao amigo **Renato Murback**, por estar sempre disponível, ser esta simpatia em pessoa, e ajudar a animar o espírito durante a execução deste trabalho.*

*Á **Márcia Graeff**, pelo bom humor de todos os dias, e pelo auxílio na execução das fotos deste trabalho.*

Ao incrível **Luiz Carlos da Silva**, que sempre me auxiliou desde os primeiros dias com os animais no biotério, pelo aprendizado, atenção e excelência no atendimento as minhas necessidades.

Aos competentíssimos **Elias, Erasmo e Richard** do **Biotério da FOB-USP**, pela maneira atenciosa que muito contribuiu para a execução deste trabalho.

A **Graciane Mainini**, que me recebeu com tanta graça e me ajudou com a documentação logo no início da minha vinda para a FOB. Suas palavras, ditas para mim naquele momento tão difícil estão sempre comigo.

Às **Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf e Ana Carolina Magalhães**, pela oportunidade concedida e aprendizado nesta linha de pesquisa.

À **Gráfica Bellas Artes & Cia**, pelo precioso trabalho de encadernação.

Aos amigos **Murilo, Luciana, Letícia, Andréia, Ivanildo, Carina, André, Mileni, Patrícia, Michele, Thaís, Ricardo, Ângela, Kelly, Luís e Fabiana** pelo companheirismo e amizade.

Aos **colegas do Laboratório de Bioquímica e da pós-graduação**, pelo convívio sempre divertido.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo**, na pessoa do seu diretor, **Prof. Dr. José Carlos Pereira**, pela formação de uma comunidade cujo objetivo comum é a excelência.

Ao **Departamento de Ciências Biológicas**, em especial o **Laboratório de Microbiologia, Laboratório de Histologia e ao Centro Integrado de Pesquisa da FOB-USP**, pelos empréstimos de equipamentos para a realização deste trabalho.

À **Aline Lima Leite**, pelo apoio técnico e disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários **Larissa** (Laboratório de Bioquímica), **Marcelo, Rafaela e Neusa** (Centro Integrado de Pesquisa), **André** (Laboratório de Microbiologia) e **Tânia** (Laboratório de Histologia) que zelaram de forma atenciosa para a realização deste trabalho e contribuíram com todo o suporte técnico.

Às **Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos e Chao Yun Irene Yan**, pelos primeiros passos na compreensão da biologia celular e molecular que tanto me ajudaram nesta etapa.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Hiroaki Kihara**, pelo apoio num momento muito complicado durante essa jornada.

Ao **Sr. Marco Aurélio B. Catalano**, por viabilizar a continuidade deste projeto.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro.

A todos que conviveram comigo durante este período.

“O melhor lucro no futuro é o passado.”

(Provérbio Chinês)

Resumo

RESUMO

O flúor é um elemento natural encontrado em diversas concentrações tanto na água como no solo. É considerado um nutriente benéfico quando presente em níveis ótimos. Apesar de ser utilizado como medicamento em pacientes com osteoporose, sendo capaz de aumentar a densidade óssea, sua eficácia na redução de fraturas ainda apresenta muitas controvérsias, e a exposição a altos níveis e por tempo prolongado, pode levar à fluorose esquelética. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi estudar *in vitro* o efeito do flúor no processo de mineralização por osteoblastos de duas espécies de camundongos com maior e menor densidade óssea, C3H/HeJ (C3) e C57BL/6J (B6) respectivamente. Os osteoblastos isolados da calvária através da digestão enzimática de animais recém nascidos foram expostos a diferentes doses de NaF, e os resultados mostraram que B6 foi mais suscetível ao NaF, apresentando redução da área mineralizada a partir da dose de 10µM, enquanto que com C3, a dose significativa foi a partir de 50µM, demonstrando que os osteoprogenitores mais diferenciados de C3, são mais resistentes à ação inibitória do flúor. Os testes de unidades formadoras de colônias indicaram um aumento do número de colônias de osteoprogenitores e do número de nódulos mineralizados com a exposição ao NaF. A atividade da metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) também foi aumentada no período de 7 dias em B6 e reduzida nos períodos de 14 e 21 dias em C3, evidenciando que a ação da MMP-2 nestes osteoblastos estão acopladas de forma distinta a diferentes pontos de restrição durante a progressão da diferenciação celular. A dualidade das respostas ao flúor apresentadas pelos modelos experimentais indica que a influência da ação anabólica do flúor, depende do número de alvos em potencial (quantidade de osteoprogenitores presentes na calvária, de células mesenquimais presentes na medula), da atividade intrínseca destes osteoblastos e do estágio de maturação dessas células. Desta forma, a abordagem *in vitro* fornece *insights* sobre as bases celulares e moleculares, o que permitirá um melhor diagnóstico e avaliação dos alvos terapêuticos.

Palavras Chave: Flúor. Mineralização. Osteoblastos. Fluorose esquelética. Osteoporose.

Abstract

ABSTRACT

Differential effects of fluoride during the mineralization of osteoblasts from two inbred strains of mice with different bone density

Fluoride is a natural element found at varying concentrations in drinking water as well as in soil and it is considered a beneficial nutrient at optimal levels. However, although it is well recognized that the fluoride therapy is effective in increasing bone density and it has been used as therapeutic agent to treat osteoporosis, the efficacy in fracture reduction is highly controversial, and exposure to high levels and prolonged time can lead to skeletal fluorosis. The purpose of this study was to investigate the in vitro effects of fluoride exposure during mineralization of two inbred strains, C3H/HeJ (C3) and C57BL/6J (B6), with high and low bone mass respectively. The osteoblasts isolated from newborn mouse calvaria were exposed to several fluoride doses, and the results showed that B6 was more susceptible to NaF, as a reduction in the mineralized area with 10 μ M was already seen; while in C3, the significative dose was with 50 μ M, indicating that more differentiated osteoprogenitors cells of C3 are more resilient to inhibitory fluoride action. The colony forming unit assays indicate an increase of colony numbers of osteoprogenitors cells and mineralized nodules with NaF treatment. The MMP-2 activity was up-regulated after 7 days of NaF exposure in B6 e down-regulated after 14 and 21 days in C3, showing the distinct coupled action of MMP-2 in different restrictions point during development sequence. The bifasic nature of fluoride responses present by these experimental models indicate that the anabolic action of fluoride is associated to the number of the potential targets (numbers of calvarial osteoprogenitors cells, mesenchymal stem cells), the intrinsic osteoblast activity and the maturation stage of these cells. The cell culture systems can provide molecular and cellular insights, and have the prospective to disclose potential targets and/or better efficacy and safety profile.

Key words: Fluoride. Mineralization. Osteoblasts. Skeletal fluorosis. Osteoporosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 - <i>Modelo de ação molecular do flúor em células ósseas</i>	59
Figura 2 - <i>Obtenção das células de medula</i>	77
Figura 3 - <i>Crescimento e morfologia de células obtidas da calvária de camundongos recém-nascidos</i>	87
Figura 4 - <i>Capacidade de biomineralização por osteoblastos isolados da calvária de camundongos recém-nascidos C3 e B6</i>	89
Figura 5 - <i>Porcentagem de área mineralizada de C3 e B6</i>	90
Figura 6 - <i>Curva Padrão de BSA</i>	91
Figura 7 - <i>Caracterização bioquímica dos osteoblastos de C3 e B6</i>	92

Figura 8 - <i>Ensaio de unidade formadora de colônias-fibroblasto, de células da medula de femur e tíbia dos camundongos B6</i>	93
Figura 9 - <i>Ensaio de unidade formadora de colônias-osteoblasto, de células da medula de femur e tíbia dos camundongos</i>	95
Figura 10 - <i>Análise da atividade de MMP</i>	96
Figura 11 - <i>Análise por densitometria das formas pró e ativada de MMP-2 de C3</i>	97
Figura 12 - <i>Análise por densitometria das formas pró e ativada de MMP-2 de B6</i>	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Família das MMPs.....	56
----------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Porcentagem
βGP	β-Glicerolfosfato
°C	Graus Celsius
AE	Atividade específica
Alpha-MEM	Minimum Essential medium - alpha medium
APMA	Para-aminophenylmercuric acetato
B6	C3H/HeJ
BSA	Bovine serum albumin
C3	C57BL/6J
CFU-F	Unidade formadora de colônias - Fibroblastos
CFU-O	Unidade formadora de colônias - Osteoblastos
cm ²	Centímetros quadrado
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGF	Fator de crescimento epidermal
FAL	Fosfatase alcalina
g	Grama
GAP	GTPase activating proteins
GDP	Guanosina Difosfato
GEF	Guanine nucleotide Exchange factors
GTP	Guanosina Trifosfato
H	Horas
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1 piperazineethanesulfonic acid)
kDa	Kilodalton
L	Litro
M	Molar
MAPK	Proteínas quinase ativadas por mitógenos
ME	Matriz extracelular
MFP	Monofluorofosfato
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MMP-2	Gelatinase A – 72kda
MMP-9	Gelatinase B – 92kda
MO	Meio osteogênico
Nmol	Nanomolar
PBS	Phosphate buffered salina
PN1	Idade pós-natal de 1 dia
pNP	P-nitrophenol
pNPP	P-nitrophenolfosfato
PPi	Pirofosfato inorgânico
PTP	Phosphotyrosine phosphatase
Ras	Subfamília das GTPases de baixo peso molecular
RPM	Rotações por minuto
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SFB	Soro fetal bovino
TGF- β	Fator de crescimento de transformação β

EU	Unidade enzimática
UV	Ultravioleta
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	41
2	REVISÃO DE LITERATURA	47
2.1	DESENVOLVIMENTO DE OSTEOLASTOS IN VITRO	50
2.1.1	PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR	52
2.1.1	METALOPROTEASES	54
2.2	FLÚOR	57
2.3	FLUOROSE	61
2.4	EFEITOS DELETÉRIOS DO FLÚOR NA DIFERENCIAÇÃO E MINERALIZAÇÃO DE OSTEOLASTOS IN VITRO	65
2.5	MODELO ANIMAL	65
3	PROPOSIÇÃO	69
4	MATERIAL E MÉTODOS	73
4.1	GRUPOS EXPERIMENTAIS	75
4.2	OBTENÇÃO DE OSTEOLASTOS	76
4.2.1	OSTEOLASTOS ORIUNDOS DE CALVÁRIA	76
4.2.2	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DE MEDULA DE FÊMUR E TÍBIA	77
4.3	INDUÇÃO OSTEOGÊNICA	78
4.4	TRATAMENTO COM FLÚOR	78
4.5	ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO	79
4.6	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA PARA TESTE DE ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA	79
4.7	TESTE DE ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA	79
4.8	ENSAIO DE UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS OSTEOBLASTO (CFU-O)	80
4.9	ENSAIO DE UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS FIBROBLASTO (CFU-F)	80

4.10	ENSAIO DE ATIVIDADE DAS MMPs – ZIMOGRÁFIA	81
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	82
5	RESULTADOS	85
5.1	ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS OSTEÓBLASTOS OBTIDOS DA CALVÁRIA	87
5.2	EFEITOS DA INDUÇÃO OSTEOGÊNICA EM OSTEÓBLASTOS DA CALVÁRIA	88
5.3	ENSAIO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA	93
5.4	EFEITOS DO TRATAMENTO COM FLÚOR NA ATIVIDADE DE MMP DE OSTEÓBLASTOS DE CALVÁRIA	95
6	DISCUSSÃO	101
7	CONCLUSÕES	113
	REFERÊNCIAS	117
	ANEXO	135

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

O flúor é um elemento natural encontrado em diversas concentrações tanto na água como no solo. É considerado um nutriente benéfico quando presente em níveis ótimos, sendo um micronutriente necessário para o crescimento e desenvolvimento de plantas e animais. É importante para a manutenção da integridade de ossos e dentes e aproximadamente 99% do flúor presente no corpo está nos tecidos mineralizados (LEVY, 2003).

Tem sido utilizado como medicamento em pacientes com osteoporose, em diversas doses e preparações. A maioria dos trabalhos têm utilizado o flúor na forma de NaF, mas também como monofluorofosfato (MFP) (SEBERT, et al., 1991; BATTMANN et al., 1997 e REGISTER, et al, 1998) e atualmente é utilizado na forma de FMS*Calciumfluor (mistura de partes iguais de CaF_2 , MgHPO_4 , SiO_2 , e 0,5% de lactose) pelo grupo de Palermo et al., (1999) e Manduca et al., (2005). Pode também ser conjugado com outros elementos como citrato de cálcio (PAK et al., 1994), cálcio e vitamina D (HAGUENAUER et al., 2000).

É capaz de aumentar a densidade do osso espinhal e a formação óssea (RIGGS, et al., 1980), mediado pela elevação do número de células ósseas (BRIANCON; EUNIER, 1981; HARRISON et al., 1981).

Porém sua eficácia na redução de fraturas apresenta controvérsias (RIGGS et al., 1994; KLEEREKOPER et al., 1998; PAK et al., 1994). A este respeito, a terapia com o flúor possui um fator de risco - benefício altamente desfavorável, onde a alta incorporação do flúor nos ossos está relacionada com a ocorrência de osteomalácia (LAU et al., 1998). A estreita janela terapêutica da ação do flúor nos ossos tem apresentado progressos, apesar das dúvidas que ainda permanecem quanto a sua efetividade na redução do índice de fraturas nas vértebras. A ausência de grandes investimentos é dada pelo baixo

preço dos sais de fluoretos e da ausência de proteção de patente do produto, e que desta forma, o flúor é rotulado como uma droga órfã (RINGE, 2002). E justamente este é o ponto que distancia os investimentos da indústria farmacêutica da terapia com o flúor, apesar do grande potencial já descrito há décadas (KLEEREKOPER, 1998).

Outro ponto importante é a ocorrência da fluorose esquelética, uma doença causada pela exposição crônica e excessiva ao flúor. No Brasil, algumas cidades da Paraíba e Ceará possuem níveis de flúor moderado a altos ($>1,0\text{mg/L}$) em rios e águas de abastecimento, resultando em alta prevalência de fluorose dentária em alguns casos. No Rio Grande do Norte, há concentrações naturais de flúor maiores que $1,1\text{ ppm (mg/L)}$ devido a alta temperatura da região (SILVA et al, 2009).

O uso do flúor para a prevenção da cárie é reconhecida como a medida pública mais efetiva existente até hoje e diversas organizações ligadas à saúde pública reconhecem os benefícios da fluoretação da água na manutenção da saúde da população.

Até recentemente, poucos estudos tem explorado as questões relacionadas às bases genéticas para a resposta ao flúor. A diversidade genética existente entre as espécies de camundongos tem proporcionado fenótipos relevantes à saúde humana, como a suscetibilidade ao câncer, envelhecimento, obesidade, suscetibilidade a doenças infecciosas, desordens neurossensoriais, etc. (EVERETT, 2010). Estudos genéticos utilizando diferentes espécies de camundongos têm explorado o efeito da ação do flúor no desenvolvimento do esmalte e na homeostase do tecido ósseo (EVERETT *et al.*, 2002, 2009; VIEIRA *et al.*, 2005; MOUSNY *et al.*, 2006, 2008; YAN *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2009; CHOU *et al.*, 2009). Apesar das diferenças entre humanos e camundongos, estes animais têm contribuído como instrumentos essenciais para a compreensão de processos celulares, moleculares e genéticos dos vários processos biológicos.

Neste sentido, Everett et al., (2002) demonstrou que a diversidade de respostas ao tratamento com o flúor está relacionada com a diversidade genética. Neste trabalho, foram examinadas 12 espécies de camundongos, nas quais se estabeleceu a existência de grupos resistentes, suscetíveis e intermediários ao tratamento com flúor, baseados na variação da fluorose dentária.

Outro importante trabalho verificou que o metabolismo do flúor difere entre A/J (susceptível ao flúor), animal que consome mais água e requer ajustes na concentração de flúor para manter exposição comparável em relação ao 129P3/J (resistente ao flúor), que apresenta maior concentração de flúor nos ossos e plasma (CARVALHO et al., 2009).

Fatores de risco (resistência e suscetibilidade), definidos pelo indivíduo e as interações ambientais, assim como os diversos fenótipos, são considerados características complexas (ou fenótipos). Estes fenótipos podem ser quantificados e estão sob o controle de múltiplos genes, assim como sujeitos a fatores não genéticos (controle ambiental). Desta forma, considerando que estudos em humanos são limitados por fatores importantes como o tamanho da amostra, ausência de genealogia familiar, e atualmente, com a utilização de análises computacionais avançadas que permite a associação ampla do genoma, os estudos nesses animais podem fornecer os subsídios sobre os efeitos do flúor em humanos (EVERETT, 2010).

A esse respeito, os camundongos utilizados neste trabalho, o C3H/HeJ (C3) e o C57BL/6J (B6) tem sido particularmente úteis nos estudos de biologia óssea, em que o primeiro apresenta maior densidade óssea e o segundo, menor densidade óssea (BEAMER et al., 1996).

2. Revisão de Literatura

2 . REVISÃO DE LITERATURA

O osso é um tecido constituído por matriz e células ósseas. A matriz óssea é composta principalmente de colágeno I e proteínas não-colágenas, como osteocalcina, osteonectina, sialo-proteína óssea e várias proteoglicanas. As proteínas não-colágenas participam no processo de maturação de matriz e podem auxiliar na regulação da atividade funcional de células ósseas.

Os osteoblastos são as células diferenciadas responsáveis pela formação e mineralização óssea, podendo ser recrutados das células-tronco mesenquimais (também chamadas de células-tronco esqueléticas ou células do estroma de medula) presentes na medula óssea (HARADA; RODAN, 2003). São reconhecidos como uma camada de células polarizadas, cubóides e basofílicas, com abundante retículo endoplasmático, e estão presentes nas superfícies do periósteo e endósteo dos locais de deposição óssea. Possuem características como alta atividade de fosfatase alcalina (FAL), síntese de colágeno tipo I e outras proteínas componentes de matriz óssea. Imediatamente subjacente aos osteoblastos, está uma camada (ou camadas) adicional de células pré-osteoblásticas (HUGHES, AUBIN, 1997).

Há ainda, mais dois tipos celulares: os osteócitos e as *células de revestimento*. Os osteócitos estão circundados pela matriz óssea mineralizada, e a comunicação celular é feita pelos prolongamentos dos processos citoplasmáticos dentro das lacunas. Possuem importante função na manutenção da massa óssea, regulação da reabsorção óssea pelos osteoclastos e modulação das respostas ao estímulo mecânico. As *células de revestimento* são células achatadas encontradas na superfície dos ossos quando não há deposição óssea, e são consideradas como osteoblastos inativos que podem ser reativados e se tornarem osteoblastos durante períodos de nova formação óssea (HUGHES, AUBIN, 1997).

Os osteoclastos, cuja função é a de reabsorção óssea, são derivados das células-tronco hematopoiéticas (BLAIR *et al.*, 2005). Os osteoblastos e osteoclastos, juntamente com seus precursores e células associadas são organizados em unidades especializadas denominadas de unidades multicelulares ósseas (FROST, 2001). A principal função dessas unidades é mediar o remodelamento ósseo, mantendo a integridade do esqueleto pela remoção óssea de alta densidade mineral, mais propensa a micro-fraturas causadas pelos ciclos repetitivos de reabsorção, assim como a formação de nova matriz óssea mineralizada (FROST, 2001 e PARFITT, 1991).

Quando a homeostase do tecido ósseo é comprometida, pode ocorrer por exemplo, a osteoporose, uma doença sistêmica caracterizada pela baixa densidade óssea originária do desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, levando à deterioração da micro-arquitetura e ao aumento da fragilidade do esqueleto, tornando-o mais suscetível a fraturas (GARNERO; DELMAS, 2004).

2.1 Desenvolvimento de Osteoblastos *In vitro*

A base para a compreensão da diferenciação das células ósseas foi estabelecido primeiramente pela identificação e caracterização de proteínas secretadas pelos osteoblastos, e proteínas associadas com a matriz extracelular (proteínas estruturais e fatores de crescimento) (STEIN; LIAN, 1993). Os osteoblastos isolados da calvária de ratos recém nascidos são capazes de diferenciação em cultura, refletindo a produção e deposição de matriz extracelular de colágeno organizada, formação de nódulos com múltiplas camadas de células, e matriz mineralizada (BELLOWS *et al.*, 1986; BHARGAVA *et al.*, 1988; ESCAROT-CHARRIER *et al.*, 1988). A formação óssea *in vitro* abrange a síntese inicial de matriz colágena não mineralizada, também conhecida como formação osteóide, que é posteriormente remodelada

com a maturação dos osteoblastos que passam a secretar as proteínas que permitirão a maturação dessa matriz, deposição de apatita biológica, mineralização e a formação de osteócitos (STEIN *et al.*, 1990 e ROBEY *et al.*, 1993).

No momento em que estes osteoblastos são colocados em cultura, há uma ativação de genes ligados à proliferação, expressão de marcadores fenotípicos como a FAL, osteopontina e osteocalcina sendo que nos primeiros 10-12 dias de cultura, este intenso período de proliferação é refletido pela intensa atividade mitótica, com expressão de genes reguladores do ciclo e crescimento celular. Quando a proliferação cessa, o nível de FAL aumenta e dá-se o início da deposição ordenada da matriz extracelular e que finalmente resulta na organização do tecido ósseo com a formação de um arranjo ortogonal das camadas de colágeno entre os osteoblastos e a matriz extracelular mineralizada (OWEN *et al.*, 1990; STEIN; LIAN, 1993).

Neste mesmo período, para o desenvolvimento dos osteoblastos, ainda é fundamental a expressão de diversos outros genes associados com a formação da matriz extracelular, como o colágeno tipo I, fibronectina e TGF- β . À medida em que as culturas progridem para o estágio de mineralização, durante a organização e mineralização da matriz extracelular, a expressão do gene da collagenase é aumentado para os níveis máximos, e assim promover o reciclagem do colágeno. Com o início da mineralização, acontece o aumento da expressão de algumas proteínas, como a sialoproteína, osteopontina e osteocalcina, paralelamente com a acumulação mineral (OWEN *et al.*, 1990; STEIN; LIAN, 1993).

Em culturas de osteoblastos obtidas de calvárias de rato, Malaval e colaboradores (1999) verificaram que a população de células capaz de mineralização corresponde a 10%. Tratam-se das células osteoprogenitoras. Estas células, após o estímulo com 50 mM de ácido ascórbico, 10 mM de β -glicéfosfato e 10 nM de dexametasona, sofrem alteração na sua morfologia, assumindo um formato cúbico, produzindo de grandes quantidades de matriz

extracelular, que eventualmente passa pelo processo de mineralização, formando assim, o nódulo mineralizado. Dentro das colônias em crescimento, na zona central encontra-se a célula morfológicamente mais diferenciada e sem a capacidade de proliferação; seguida pela zona intermediária e na periferia, as células menos diferenciadas do nódulo, em que a divisão celular persiste. No final do período de maturação, o desenvolvimento da colônia cessa e a morfologia cuboidal assim como a mineralização se estende por toda a periferia da colônia (MALAVAL et al., 1999).

2.1.1 Proteínas da Matriz Extracelular

A produção da matriz orgânica é, em grande parte, o resultado da atividade dos osteoblastos. A matriz consiste de aproximadamente 90% de colágeno tipo I, e o restante de proteínas não-colágenas, como a osteopontina, osteonectina e sialoproteína óssea. Destas proteínas, apenas a osteocalcina e a sialoproteína óssea são relativamente restritas aos osteoblastos, mas muitas das proteínas acima citadas estão altamente expressas pelos osteoblastos durante a osteogênese e, desta forma, podem ser utilizadas como marcadores de fenótipo dos osteoblastos (HUGHES; AUBIN, 1997). Apenas a osteopontina tem sua expressão durante dois períodos: durante o período de proliferação ativa (a 25% dos níveis máximos), e no início da mineralização (STEIN et al., 1993).

Os osteoblastos também podem expressar outros tipos de proteínas não-colágenas, porém estas são marcadores menos eficientes devido à sua baixa especificidade ou porque ainda pouco se sabe sobre o seu padrão de expressão durante a proliferação e diferenciação. São elas: as proteínas ligadas à adesão celular como a fibronectina, trombospondina e tenascina; e as proteoglicanas, como a decorina e a biglicana (HUGHES; AUBIN, 1997).

A osteocalcina é a proteína não-colágena “mais exclusiva” dos osteoblastos, e sua expressão está restrita a tecido mineralizados, ou seja, está presente em osteoblastos, odontoblastos, cementoblastos e condrócitos hipertróficos. É inicialmente sintetizada como um precursor de 10 kDa (STEIN et al., 1993) e constitui mais de 10% das proteínas não-colágenas do osso maduro, estando presente em baixas concentrações em ossos de origem embrionário. Devido à sua expressão ser relativamente específica em osteoblastos, a osteocalcina tem sido amplamente utilizada como marcador dessas células, e é usada clinicamente em imuno-ensaios do soro, para diagnósticos de formação óssea (HUGHES; AUBIN, 1997).

A osteonectina é uma proteína de 32 kDa originariamente isolada de células ósseas mas que é encontrada em outros tecidos, desde embrionários até adultos, em fibroblastos, células endoteliais, de pulmão e de ovário (HUGHES; AUBIN, 1997).

De acordo com Sodek e colaboradores, a osteopontina é a uma fosfoproteína específica de transformação, sendo a principal sialoproteína secretada. O nome foi dado no intuito de refletir o potencial desta proteína em servir como uma ponte entre as células e a hidroxiapatita, através dos grupos RGD (tripeptídeo Arg-Gly-Asp) e ácido poli-aspartico na sequência primária da proteína. Porém, mais tarde, o padrão de expressão mais geral emergiu, com a sua identificação em outros tipos celulares, e desta forma, para melhor retratar seu papel funcional, também pode-se encontrar essa proteína como fosfoproteína secretada I (*Secreted Phosphoprotein I – SPP I*). É expressa como uma proteína nascente de cerca de 34 kDa, que passa por extensiva modificação pós-traducional, que resulta em uma proteína de 44 kDa a 75 kDa e pode ser identificada como formas pouco e altamente fosforiladas em osteoblastos diferenciados (KUBOTA et al., 1989). Apresenta padrão bifásico em que é produzida no início da diferenciação dos osteoprogenitores e com maiores níveis após a iniciação da mineralização (MCKEE E NINCI, 1995). Seu papel em tecido mineralizados parece estar relacionado com a migração dessas células, na sinalização via integrinas $\alpha_v\beta_3$, que podem influenciar a

proliferação celular, organização do citoesqueleto, motilidade, apoptose e fagocitose. (SODEK et al., 2001).

A FAL catalisa a hidrólise de monoésteres de ácido fosfórico e a reação de trans-fosforilação na presença de altas concentrações dos aceptores de fosfato, possuem homologia com um grande número de outras enzimas, sendo parte de uma superfamília de enzimas com semelhanças em algumas propriedades catalíticas e substratos. É extensamente utilizada como marcador de osteoblastos. Também encontrada em muitos organismos, desde bactéria ao homem. Com poucas exceções, são enzimas homodiméricas e cada domínio catalítico contém três íons metálicos, dois zinco e um magnésio, necessários para a sua atividade enzimática. (MILLAN, 2006).

Quanto à sua função em tecidos ósseos, tem sido proposto que a FAL tem papel na geração de fosfato inorgânico necessário para a cristalização da hidroxiapatita (MAJESKA; WUTHIER, 1975 e FALLON et al., 1980); outros indicam sua importância na hidrólise do inibidor da mineralização, o PP_i , para facilitar a precipitação e crescimento do mineral (MOSS et al., 1967; WHYTE, 1994 e REZENDE et al., 1998). Alguns estudos têm mostrado fortes evidências de que a principal função da FAL no tecido ósseo consiste na hidrólise do PP_i para a manutenção correta da concentração deste inibidor da mineralização e assegurar assim a correta biomineralização (HESSLE et al., 2002 e HARMEY et al., 2004)

2.1.2 Metaloproteases

A morfogênese óssea também depende de outros programas genéticos intrínsecos como as interações entre as células e das células com a matriz extracelular (ME). A família de metaloproteases de matriz (MMP: *Matrix Metalloproteinases*) catalisa e degrada os constituintes protéicos da ME, para

criação de espaço, favorecimento da migração celular, produção de fragmentos resultantes de clivagem de substratos específicos com atividade biológica independente, regulação da arquitetura do tecido através dos efeitos na ME e junções intercelulares, e ativação/desativação/modificação da atividade de moléculas sinalizadoras, tanto direta como indiretamente. Influencia diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo aspectos do desenvolvimento embrionário, morfogênese tecidual, processo de reparo e doenças inflamatórias (PAGE-McCAW *et al.*, 2007). Estas proteínas possuem pelo menos um pró-domínio conservado com cerca de 80 aminoácidos e um domínio catalítico com o íon zinco em seu sítio ativo ligado a três resíduos de histidina (PARKS *et al.*, 2004). Compõem uma família de pelo menos 24 endopeptidases dependentes de zinco, capazes de degradar praticamente todos os componentes da matriz extracelular (Tabela 1).

As gelatinases (MMP-2 e -9) degradam pequenos fragmentos de colágeno, liberados durante a atividade das collagenases com peso molecular de 72-kDa e 92-kDa, respectivamente (PAGE-McCAW *et al.*, 2007; PASTERNAK; ASPERBERG, 2009). *In vitro*, as MMPs 1, 2, 8, 13 e 14 clivam a tripla hélice do colágeno intersticial (macromoléculas com longas e ininterruptas triplas hélices). No colágeno tipo I, o maior colágeno do osso, a clivagem ocorre entre Gly₇₇₅/Ile₇₇₆ na cadeia $\alpha 1(I)$ e o correspondente Gly/Leu na cadeia $\alpha 2(I)$, produzindo um fragmento grande (chamado de fragmento A) e outro pequeno (chamado de fragmento B). No colágeno tipo II, o maior colágeno da cartilagem articular e placa de crescimento, o sítio de clivagem está entre Gly₇₇₅/Leu₇₇₆ na cadeia $\alpha 1(II)$ do homotrímero.

Dentre os mais de 20 membros que compõe a família de MMPs, a ausência de MMP-9 leva ao atraso do reparo de fraturas ósseas (COLNOT *et al.*, 2003) e tanto MMP-9 quanto a -13 estão associadas a defeitos durante o desenvolvimento ósseo (STICKENS *et al.*, 2004, INADA *et al.*, 2004) assim como a MMP-14 foi relacionada com defeitos no remodelamento do esqueleto (HOLMBECK *et al.*, 1999, 2005; BIRKEDAL *et al.*, 1993; EGEBLAD *et al.*, 2002) e inibição da erupção do dente e alongamento da raiz (ZHOU *et al.*, 2004). As

mutações no gene que codifica a MMP-2 estão ligadas à formação de nódulos cutâneos, artropatia e osteólise focal (INOUE et al, 2006) e associada a síndromes que incluem como características anormalidades na face, baixa estatura e severa perda óssea em humanos (EGEBLAD et al, 2007).

Group	MMP	Collagenous substrates	Noncollagenous ECM substrates	Nonstructural ECM component substrates
Collagenases				
Collagenase 1	MMP-1	collagens I, II, III, VII, VIII, X, XI, gelatins	proteoglycans, fibronectin, entactin, laminin, tenascin, vitronectin	α -1-antiprotease, pro-TNF α
Collagenase 2	MMP-8	collagens I, II, III, V, VII, VIII, X	fibronectin, laminin, proteoglycans	ADAMTS-1, pro-MMP-8
Collagenase 3	MMP-13	collagens I, II, III, IV, V, VII, IX, X, gelatins	proteoglycans, fibronectin, laminin, tenascin	fibrinogen, proMMP-9 and -13
Gelatinases				
Gelatinase A	MMP-2	gelatins, collagens I, II, III, IV, VII, X	laminin, elastin, fibronectin, proteoglycans	pro-MMPs -9 and -13, α -1-antiprotease, IGFBPs, IL-1 β , TGF β
Gelatinase B	MMP-9	gelatins, collagens IV, V, VII, X, XI	laminin, elastin, fibronectin, proteoglycans	α -1-antiprotease, CXCL5, IL-1 β , TGF β , plasminogen
Stromelysins				
Stromelysin 1	MMP-3	collagens III, IV, V, VII, IX, X, XI, gelatins	laminin, fibronectin, elastin, proteoglycans	pro-MMPs, pro-TNF α , E-cadherin, L-selectin, fibrinogen
Stromelysin 2	MMP-10	collagens I, III, IV, V, IX, X, gelatins	laminins, proteoglycans	pro-MMPs
Matrilysins				
Matrilysin 1	MMP-7	gelatins, collagens I and IV	laminin, elastin, fibronectin, proteoglycans, tenascin	pro-MMPs, pro- α -defensin, pro-TNF α , E-cadherin
Matrilysin 2	MMP-26	as above	as above	as above
Membrane-type (MT) MMPs				
MT1-MMP	MMP-14	gelatin, collagens I, II, III	proteoglycans, fibronectin, tenascin, fibrinogen	Pro-MMP-2 and -13
MT2-MMP	MMP-15	gelatins, collagen III		Pro-MMP-2
MT3-MMP	MMP-16		fibronectin	Pro-MMP-2
MT4-MMP	MMP-17			
MT5-MMP	MMP-24	gelatin	fibronectin	Pro-MMP-2
MT6-MMP	MMP-25			
Other MMPs				
Stromelysin 3	MMP-11		fibronectin	α -1-antiprotease, serpins
Metalloelastase	MMP-12	collagens, gelatins	elastin, proteoglycans	plasminogen
RASI	MMP-19		components of basement membranes	
Enamelysin	MMP-20		amelogenin	
-	MMP-21	gelatin		
-	MMP-23			
-	MMP-27			
Epilysin	MMP-28			Pro-TGF β

ADAMTS: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs; ECM: extracellular matrix; TGF: transforming growth factor; TNF: tumor necrosis factor; RASI: rheumatoid arthritis synovial inflammation; IGFBP: insulin growth factor binding protein; CXCL: CXC chemokine ligand.

Tabela 1: Família das MMPs. Fonte: Pasternak e Aspenberg, 2009.

2.2 Flúor

O flúor é utilizado como inibidor clássico de diferentes enzimas, e segundo Lau e Baylink (1998), possui diversas propriedades relevantes no seu mecanismo molecular de ação: (1) em células ósseas, tem ação mitogênica em concentrações micromolares, (2) *in vivo*, o efeito anabólico do flúor é específico de tecidos mineralizados, e a atividade mitogênica *in vitro* também é específica das células ósseas (3) parece necessitar de um fator de crescimento como o fator de crescimento de transformação β (TGF- β) para a atividade mitogênica (4) a atividade mitogênica é sensível às alterações da concentração de fosfato no meio (5) age preferencialmente em células progenitoras que sintetizam fatores de crescimento de forma abundante, ao invés de estimular a proliferação de osteoblastos maduros, e finalmente, (6) a atividade mitogênica envolve o aumento da fosforilação da tirosina de diversas proteínas de sinalização celular, inclusive as proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK).

O modelo proposto por esses autores envolve a ativação da via de sinalização Ras-Raf-MAPK devido ao bloqueio da tirosina fosfatase (Phosphotyrosine phosphatase – PTP) pelo flúor. Na via de Ras-Raf-MAPK, a ligação do fator de crescimento com o seu receptor, leva à autofosforilação do receptor, que inicia a reação de ativação da cascata de sinalização celular. A ativação do receptor resulta no recrutamento de proteínas como Grb, que ativa a SOS, que por sua vez media a troca do GDP por GTP de Ras.

As proteínas Ras ciclam entre um estado ativo (ligadas ao GTP) e inativo (ligadas ao GDP), sendo reguladas positivamente por fatores que catalisam a troca de GDP por GTP (Guanine nucleotide Exchange factors - GEFs) e negativamente por proteínas ativadoras de GTPases, que aceleram a hidrólise do GTP (GTPase activating proteins - GAPs). Quando ativadas, graças a uma isoprenilação na porção carboxi-terminal, translocam-se para a membrana, onde interagem com diferentes proteínas efetoras. A inativação de

Ras é mediada pelo GAP, que hidroliza a ligação de GTP por GDP. A fosforilação da tirosina do GAP leva sua a dissociação de Ras, prevenindo assim a hidrólise do GTP e mantendo Ras ativado (AZNAR; LACAL, 2001; TAKAI *et al*, 2001; BOETTNER e Van AELST, 2002; JAFFE; HALL, 2005).

A ligação do GTP ativa Ras, o que leva a ativação e fosforilação da tirosina de Raf. Raf fosforila e ativa MAPK/ERK, que fosforila MAPK nos resíduos de treonina e tirosina, resultando na sua ativação. As MAPKs ativadas migram para o núcleo, fosforilam e ativam diversos fatores de transcrição e proto-oncogenes, que resultam no aumento da expressão gênica, síntese de DNA, proliferação e/ou diferenciação celular. Desta forma, esta via de sinalização possui pelo menos, quatro pontos regulatórios (o receptor do fator de crescimento, GAP de Ras, Raf e MAPK), em que o flúor, após a entrada na célula, pode inibir a atividade das PTPs, o que consequentemente leva à hiperfosforilação da tirosina quinase e ao aumento da resposta dessa via (figura 1).

Desta forma, o flúor figura como o agente mais potente quando comparado com outros agentes anabólicos (que se concentram na inibição da reabsorção), sendo capaz de estimular a atividade de osteoblastos pela indução do desacoplamento entre reabsorção e formação óssea para o favorecimento da formação e conseqüentemente, a um aumento no volume ósseo (MERZ, 1981; LAU; BAYLINK, 1998 e CAVERZASIO *et al.*, 1998).

Farley e col., 1983 forneceram as primeiras evidências da ação direta e dupla do flúor em cultura de células ósseas, demonstrando que nas culturas de calvária de pintos, o flúor foi capaz de aumentar a proliferação e a atividade da FAL quando em concentrações micromolares (cerca de 10 μ M, similar aos níveis encontrados no soro de pacientes submetidos ao tratamento com flúor, cujos limites encontram-se entre 5-30 μ M), além de aumentar a mineralização dessas células.

Resultados semelhantes foram observados em outras espécies, confirmando o efeito mitogênico do flúor em linhagem de osteosarcoma (Reed *et al.*, 1993), humanos (WERGEDAL *et al.*, 1988; KHOKHER; DANDONA, 1990 e KASSEM *et al.*, 1993) e ratos (MODROWISK *et al.*, 1992; BELLOWS *et al.*, 1993 e QU *et al.*, 2008).

Existem evidências substanciais associando as MMPs e o tratamento com flúor. Os osteoblastos de rato tratados com flúor *in vitro*, apresentaram uma redução na expressão protéica de MMP1, com aumento em MMP-3 e 9 (WADDINGTON; LANGLEY, 2003) e aumento na expressão gênica de MMP-2 e 14 (MANDUCA *et al.*, 2005). A ampla presença de substratos de MMP e sua presença ubíqua durante a remodelação do tecido enfatizam o impacto dessas endopeptidases durante a mineralização.

Em relação à diferenciação celular, o tratamento com o flúor foi capaz de alterar a mineralização óssea, aumentando a atividade da FAL em osteoblastos de humanos (KASSEM *et al.*, 1994 e KHOKER; DANDONA, 1990), ratos (PALERMO *et al.*, 1999 e MANDUCA *et al.*, 2005). Possui efeito estimulatório na produção de osteocalcina em células humanas derivadas do

estroma (KASSEM *et al.*, 1994) em osteoblastos obtidos a partir da migração de fragmentos da tíbia de rato (MANDUCA *et al.*, 2005), provocando alteração pós-traducional do agrupamento de cadeias glicosaminoglicanas em células da medula de ratos (WADDINGTON; LANGLEY, 1998), alterando as características das proteoglicanas de osteoblastos em embriões de galinha (RODRIGUEZ; ROSSELOT, 2001), assim como a expressão gênica de biglicana e integrinas (MANDUCA *et al.*, 2005).

Entretanto, é relevante destacar também que, há controvérsias a respeito da eficiência do flúor na redução de risco de fraturas (RIGGS *et al.*, 1994 e KLEEROKOPER *et al.*, 1991), podendo causar outros efeitos colaterais como distúrbios gastrointestinais e dores nas extremidades (HAGUENAUER *et al.*, 2000 e SCHNITZLER; SOLOMON, 1985).

A ingestão persistente e exagerada de flúor pode romper o balanço entre a deposição e o remodelamento ósseo e causar a fluorose, que pode ser tanto esquelética quanto dentária.

2.3 Fluorose

Um sólido conceito já estabelecido em saúde ambiental, é que, os efeitos dos agentes tóxicos seguem um processo contínuo de mudança biológica, transitando de sintomas praticamente indetectáveis quando em baixos níveis de exposição, até os severos danos à saúde em altas doses (HILEMAN, 1988). A deficiência de flúor resulta em retardo no crescimento e desenvolvimento, enquanto que a ingestão excessiva pode levar à esclerose do esqueleto (RINGE, 2002). Com o aumento da exposição ao agente, o primeiro efeito detectável pode ocorrer como uma leve alteração bioquímica, como por exemplo, a redução da atividade de alguma enzima. Esta elevação da dose causa as eventuais alterações nas funções fisiológicas, mas ainda são

raramente detectadas como sintomas ou efeitos adversos desse agente, e neste caso, podem ser considerados como “precursores” dos efeitos mais sérios. À medida em que essa dosagem aumenta, os efeitos adversos começam a aparecer como sintomas moderados, que finalmente progridem para os casos mais severos (HILEMAN, 1988).

A fluorose esquelética é causada pela exposição crônica e excessiva ao flúor (ingestão de mais de 10mg por dia, por pelo menos 10 anos), uma condição caracterizada pelo surgimento da osteoesclerose, calcificação dos ligamentos, e frequentemente acompanhada pela osteoporose, osteomalácia ou osteopenia (JOHNSON et al., 2007 e EVERETT, 2010). Esta exposição pode ocorrer através da ingestão ou inalação, sendo mais comumente causada por altos níveis de flúor na água ou exposição a chaminés ou pó industrial. Outras fontes potenciais de exposição significativa incluem alguns tipos de chá e vinhos, suplementos fluoretados, dentifrícios e enxaguantes bucais (KRISHNAMACHARI, 1986). É endêmico em algumas partes do mundo, mais precisamente na Índia, África e China, que apesar de milhões de pessoas serem afetadas em todo mundo, é fato raro em áreas como a Europa e América do Norte. Nestes casos, o que acontece, é o consumo excessivo de chás, vinhos, água ou dentifrício fluoretados (KURLAND et al., 2007; CUNDY, 2007; WHYTE et al., 2005 e JOSHI et al., 2010).

No estudo de uma região do Tibet, a ingestão diário de flúor do adulto alcançou o pico de 12 mg, sendo que 99% era proveniente consumo de chá (*brick-tea*) (CAO et al. 2003), Shashi e colaboradores (2008) relataram que na Índia, os pacientes com fluorose, estavam expostos por mais de 15 anos a concentração de flúor na água que variava de 2,3 a 22,5 mg/L. Johnson e colaboradores (2007) destacaram o peculiar caso de quatro pacientes que foram diagnosticados com osteoesclerose nos Estados Unidos. Verificou-se que três desses pacientes possuíam níveis tóxicos de flúor no soro ($>15\mu\text{mol/L}$). Apesar do quadro clínico variar entre os pacientes, todos sofreram um aumento na densidade óssea da coluna espinhal que foi proporcionalmente maior que a densidade mineral óssea do quadril. Outros

aspectos clínicos incluíram sintomas gastrointestinais como vômito, náusea, perda de peso; dores nas extremidades inferiores acompanhado por fraturas provocadas pelo estresse dessas extremidades, insuficiência renal, elevação nos níveis da FAL. A fluorose desses pacientes com comportamento compulsivo-obsessivo associado ao consumo de chás prontos, com altos níveis de flúor, apresentou as mesmas características das áreas endêmicas.

O flúor é rapidamente absorvido pelo trato intestinal, sendo que aproximadamente 50% é incorporado nos ossos, principalmente como hidroxifluoroapatita e o restante é excretado através da urina (WHITFORD, 1994). Apesar de estimular a proliferação de osteoblastos e aumentar a formação óssea, este osso formado pode ser anormal e de qualidade inferior (GRUBER; BAYLINK, 1991; RIGGS et al., 1994 e BALENA et al., 1998). Uma vez incorporado no esqueleto, possui meia vida de cerca de sete anos (JOSHI et al., 2010).

A fluorose esquelética possui inúmeros estágios, sendo os dois primeiros, pré-clínicos, ou seja, o paciente não é capaz de sentir os sintomas, apesar dessas alterações já serem uma realidade para este paciente. No primeiro estágio pré-clínico, anormalidades bioquímicas ocorrem no sangue e na composição dos ossos, e no segundo, há alterações histológicas nas biópsias dos ossos (HILEMAN, 1988).

No início do primeiro estágio clínico da fluorose esquelética, os sintomas incluem dores nos ossos e nas juntas, sensações de queimação e formigamento nos membros, fraqueza muscular, fadiga crônica, distúrbios gastrointestinais e redução do apetite. Durante esta fase, as alterações na pélvis e na coluna podem ser detectadas em raio X, e o osso exibe uma estrutura mais proeminente e mal definida (HILEMAN, 1988). As características radiológicas desta doença incluem: aumento da densidade óssea, ofuscamento da trabécula, compactação da espessura do osso, formação de osso no perióstio e ossificação de tendões, ligamentos e músculos, (WANG et al,

1994), ocorrendo principalmente na coluna espinhal, pélvis e quadris (STEVENSON; WATSON, 1957)

No segundo estágio clínico, as dores nos ossos são uma constante e há a calcificação de alguns ligamentos. A osteoporose pode ocorrer em ossos longos, além de sintomas iniciais de osteoesclerose (a condição em que os ossos se tornam mais densos e com estrutura dos cristais anormais) e osteomalacia. Esporões ossificados podem aparecer nos membros, principalmente ao redor do joelho, cotovelo e na superfície da tíbia e ulna. Nos estágios mais avançados, chamados de fluorose esquelética deformante, há o enfraquecimento das extremidades e dificuldade na movimentação de juntas. As vértebras podem se fundir parcialmente, paralisando o paciente (KRISHNAMACHARI, 1986).

A análise de biopsias de osso da crista ilíaca descalcificada de quatro crianças (6 a 11 anos) com fluorose esquelética, na qual apresentavam deformidades severas na coluna espinhal, quadril e joelhos, mostrou que houve um espessamento, e formação de osso trabecular hipercalcificado com desorganização na orientação lamelar (TEOTIA et al., 1971). Segundo Lian e Wu (1986), a osteopenia na fluorose ocorre em ossos longos, tal como a parte distal do rádio, e são os primeiros sinais do desenvolvimento da fluorose esquelética. Porém os mesmos autores também relatam a ocorrência de osteoesclerose na coluna espinhal e pélvis, concluindo que os esqueletos axial e apendicular exibem respostas distintas durante o processo patológico. KRISHNAMACHARI (1986) relatou severa osteoporose na região distal do fêmur, região proximal da tíbia e região proximal da fíbula juntamente com a redução da densidade dos ossos do metacarpo.

Neste ponto, é importante destacar que são diversos os fatores que podem influenciar o tipo de alteração provocado pela intoxicação com o flúor nos ossos, dentre eles a natureza, dose e duração da exposição, status nutricional, respostas hormonais, idade, sexo, tipo de osso afetado (compacto ou trabecular), herança genética e hábitos nutricionais (WANG et al., 1994).

2.4 Efeitos Deletérios do Flúor na Diferenciação e Mineralização de Osteoblastos *In vitro*

Estudos demonstraram que há variações da ação do flúor sobre osteoblastos. As concentrações de 10^{-4} a 10^{-3} M de NaF provocaram a morte de osteoblastos provenientes de caprinos *in vitro* (QU *et al.*, 2008), e em osteoblastos obtidos de calvária de ratos expostos a doses de 0,5-30mg/l de NaF (YAN *et al.*, 2008). De acordo com Belows *et al.*, 1993 a mineralização foi inibida de forma dose-dependente nas culturas em que a formação osteóide e o início de mineralização ocorreram na presença de flúor, assim como quando os nódulos osteóides que se desenvolveram na ausência de flúor foram expostos ao flúor na fase de iniciação da mineralização. Qu *et al.*, 2008 também verificaram a redução de nódulos mineralizados nas concentrações de 5×10^{-4} e 10^{-3} M de NaF.

Conseqüentemente, para que a terapia com flúor seja efetiva, há que se melhorar esta relação de risco-benefício, ou seja, a elucidação dos mecanismos moleculares da ação do flúor em células ósseas tem o potencial de auxiliar no planejamento de estratégias mais eficazes, assim como identificar alvos potenciais para o desenvolvimento de drogas de maior eficiência e segurança (LAU; BAYLINK, 1998).

2.5 Modelo Animal

O pico de densidade óssea é considerado um dos determinantes mais significativos para a ocorrência de fraturas características da osteoporose em humanos. No esqueleto adulto, o pico de densidade óssea é alcançado no final do período da puberdade, aproximadamente entre 18-22 anos, e está fortemente regulado pela característica genética de cada indivíduo. Estudos

realizados com irmãos gêmeos e grupos de mães e filhas mostram que cerca de 79% da variabilidade na densidade óssea é baseada na genética dos indivíduos (BEAMER et al, 1996).

Desta forma, os modelos animais são críticos para auxiliar na definição da regulação genética da densidade óssea. Neste sentido, camundongos têm sido utilizados para estudos genéticos devido à isogenia intra-específica e a heterogenidade genética entre as espécies. A diversidade genética existente entre as espécies de camundongos fornece fenótipos relevantes a saúde humana, como a suscetibilidade ao câncer, envelhecimento, obesidade, suscetibilidade a doenças infecciosas, arterosclerose, distúrbios neurosensoriais, etc (EVERETT, 2010).

Assim, duas espécies de camundongos têm sido utilizadas nos estudos de biomecânica dos esqueletos. Estudos comparativos entre os camundongos C3H/HeJ e C57BL/6J que exibem maior e menor massa óssea respectivamente (BEAMER et al.,1996), demonstraram que a vibração mecânica de baixo nível (estímulo mecânico anabólico) estimulou a formação óssea na tíbia proximal em C57BL/6J mas não alterou as propriedades do tecido trabecular em C3H/HeJ (JUDEX et al.,2002). A cultura de osteoblastos do C3H/HeJ apresentou maior capacidade de diferenciação, atividade de FAL, e formação de nódulos mineralizados (SHENG et al.,2004), expressão gênica de *Cbfa1*, colágeno I, osteopontina e osteocalcina e menor índice de apoptose (SHENG et al., 2006) quando comparados com o C57BL/6J, sustentando a premissa de que as diferenças no índice de densidade e formação óssea entre esses animais está relacionado com as características intrínsecas destes osteoblastos.

Essas duas espécies de camundongos estão presentes em diversos estudos em biologia óssea, resultando atualmente em cerca de 76 artigos publicados, formando a base para os estudos envolvendo o flúor (EVERETT, 2010).

3. Proposição

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste projeto foi estudar *in vitro* o efeito do flúor no processo de mineralização por osteoblastos de duas espécies de camundongos com maior e menor densidade óssea, C3H/HeJ (C3) e C57BL/6J (B6) respectivamente.

4. Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em três etapas. A primeira etapa compreende a obtenção de osteoblastos provenientes da digestão enzimática de calvárias de camundongos recém-nascidos, em idade pós-natal de um dia (PN1) e as análises para verificação da progressão da mineralização dessas células. Na segunda etapa, utilizou-se células oriundas da medula de fêmur e tíbia desses camundongos para realização do teste de unidade formadora de colônias. A terceira etapa deste trabalho corresponde à análise molecular da atividade de MMP através da técnica de zimografia.

4.1 Grupos experimentais

Foram utilizados duas espécies de camundongos, o C3H/HeJ e C57BL/6J, e mantidos no Biotério Central da FOB-USP, com temperatura controlada ($23\pm1^{\circ}\text{C}$) e em regime de fotoperíodo 12h/12h (período claro começando às 7:00h), recebendo água e ração comercial *ad libitum*. O protocolo para uso de animais em experimentação foi realizado segundo os princípios éticos recomendado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e após aprovação pelo Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa com animais da FOB-USP (21/2008).

4.2 Obtenção de osteoblastos

4.2.1 Osteoblastos oriundos de calvária

Para obtenção dos osteoblastos de calvária, foram utilizados animais em idade adulta (a partir de dois meses). Dois dias antes do acasalamento, as fêmeas foram colocadas nas caixas dos machos para a sincronização do cio. Em seguida, duas a três fêmeas foram acasaladas com cada macho. A cada dia foi verificado a rolha vaginal, e a fêmea fertilizada foi separada e identificada. Os filhotes foram utilizados com a idade pós-natal de um dia (PN1).

Os animais recém-nascidos (PN1) foram decapitados e as cabeças dos animais coletados e colocados em meio de transporte (Alpha-MEM, 25mM de HEPES, 1% de antibiótico) a 4°C. Com um pequeno corte sobre o focinho, a pele foi cortada e rebatida para expor a calvária. Esta foi removida com um corte a partir do meato auditivo externo passando sobre os ossos parietais e seguindo em direção ao globo ocular. Após retirar o tecido aderente, a calvária foi armazenada em meio de transporte a 4°C.

Após isolar todas as calvárias, estas foram limpas, cortadas em pequenos pedaços, lavadas 3 vezes com PBS a 4°C e incubadas com tripsina 0,1% por 10 minutos a 37°C. Esta primeira população de células foi descartada, e as calvárias foram incubadas com collagenase 2mg/ml por 90 minutos com agitação constante. O sobrenadante foi coletado e a collagenase neutralizada com metade do volume de SFB. As células foram plaqueadas na densidade de $0,7 \times 10^4$ células/cm² e cultivados em meio alpha-MEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% antibióticos.

As culturas foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C em uma atmosfera de 5% CO₂. O subcultivo foi realizado quando as culturas atingiram a subconfluência. As células foram lavadas duas vezes com PBS sem Ca⁺² e Mg⁺² e adicionou-se a tripsina (tripsina 0,25% + EDTA 0,01%) por 5 minutos a

37°C. A tripsina foi neutralizada com alpha-MEM contendo 10% de SFB e 1% antibióticos, e as células foram centrifugadas 800 rpm por cinco minutos. Neste ponto as células foram replaqueadas para novo crescimento ou foram congeladas. Neste estudo, foram utilizadas as passagens 1 a 3 (Sheng et al, 2004).

4.2.2 Obtenção das células de medula de fêmur e tíbia

Para obtenção das células da medula, foram utilizados animais adultos, (de dois meses a oito meses). Os fêmures e tíbias foram removidos, limpos de qualquer tecido aderente e colocados em meio de transporte a 4°C. Em seguida, as extremidades de cada fêmur e tíbia foram retiradas para a exposição da medula óssea. Os ossos foram inseridos em microtubos adaptados (conforme a figura 2) e centrifugados por 1 minuto a 400g para retirada das células. O pelete foi ressuspensionado em meio de cultura complementado com SFB e antibióticos (Peister et al., 2004).

Figura 2: Obtenção das células de medula. Adaptado de Peister et al., (2004).

4.3 Indução Osteogênica

Na indução da mineralização das células foi utilizado meio osteogênico (MO) que consistiu de meio normal (alpha-MEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% antibióticos) suplementado com 50µg/ml de ácido ascórbico 2-fosfato e 10mmol/l de β-glicerolfosfato (βGP) (Sheng *et al.*, 2004). No ensaio de unidade formadora de colônias-osteoblasto, foi utilizado o meio completo (alpha-MEM contendo 15% SFB, 1% antibióticos, 50µg/ml de ácido ascórbico 2-fosfato e 10mmol/l de βGP). Para o ensaio de CFU-F, utilizou-se DMEM contendo 10% de SFB.

4.4 Tratamento com Flúor

As células da calvária foram incubadas por 2 dias com meio normal e em seguida todo o meio foi substituído por MO (Sheng *et al.*, 2004) acrescido com NaF nas concentrações de 0, 5, 10, 25, 50 e 75 µM. Apenas metade do volume do meio foi trocado a cada 2-3 dias.

Para a verificação da atividade da FAL, os osteoblastos foram tratados com as diversas doses de flúor e coletados nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias após o início da exposição ao NaF. No caso do ensaio de mineralização, as culturas foram coletadas após 28 e 35 dias após o início do tratamento com o flúor.

Nos ensaios de CFU-F e CFU-O, 72h após o plaqueamento das células o meio foi trocado e as diversas doses foram aplicadas nas culturas. Para o CFU-F o meio foi trocado a cada 5 dias e analisados após 13 dias de cultivo e no caso de CFU-O, o meio foi trocado a cada três dias e as culturas foram analisadas após 21 dias de tratamento.

4.5 Ensaio de mineralização

As células da calvária foram plaqueadas ($1,4 \times 10^4$ células/cm²) e cultivadas por 28 dias. Após este período, as culturas foram fixadas com etanol 100% por 10 minutos, lavadas com PBS três vezes e cobertas com nitrato de prata 5% e mantidas na luz UV por 30 minutos. Após a lavagem com PBS (três vezes), foi adicionado uma solução de tiosulfato de sódio 5% por 5 minutos e lavados novamente. Para o ensaio de mineralização das células da calvária, a placa foi escaneada com o auxílio da Câmera GL 100 (KODAK) e os nódulos mineralizados foram analisados com o Software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD).

4.6 Extração de Proteína para Teste de atividade da Fosfatase alcalina

Foram plaqueadas $1,1 \times 10^4$ células/cm². Em cada período analisado, as células foram coletadas e lavadas com PBS, e adicionou-se 400µl de tampão de lise (10mM Tris HCl pH7,5; 0,5mM MgCl₂; 0,1% Triton X-100). As células foram removidas e sonicadas com 20 pulsos, a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 14000rpm e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem da atividade da fosfatase alcalina e para quantificação de proteína.

4.7 Teste de atividade da Fosfatase Alcalina

A atividade da fosfatase alcalina foi determinada com o p-nitrofenilfosfato como substrato (Glicina 25mM, 2 mM de MgCl₂ e 1 mM de p-nitrofenilfosfato) por 30 minutos a 37°C. Ao final deste período foi acrescentado o NaOH 1M. O p-nitrophenol (pNP) liberado foi medido a 405 nm ($\xi = 1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A

atividade específica (AE) é a unidade enzimática (UE) expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}$ por mg de proteína.

Os resultados foram expressos em nmol de p-nitrofenol produzido por minuto por mg de proteína. A quantidade total de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Foi utilizada a curva padrão de BSA (Bovine Serum Albumin) e as amostras foram correlacionadas com a curva padrão. A partir da absorbância lida, a 595nm, foi calculada a quantidade total de proteína em cada amostra.

4.8 Ensaio de Unidade Formadora de Colônias-Osteoblasto (CFU-O)

Após a retirada das células da medula $1,12 \times 10^5$ células/ cm^2 foram plaqueadas em meio completo por 21 dias. Os nódulos mineralizados foram identificados pela coloração de Von Kossa, e as colônias contendo >50 células marcadas positivamente foram determinadas pela contagem (Malaval et al., 2008).

4.9 Ensaio de Unidade Formadora de Colônias-Fibroblasto (CFU-F)

As células foram plaqueadas na densidade de $1,12 \times 10^5$ células/ cm^2 em meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB com diversas doses de NaF (0, 5, 10, 25, 50 e 75 μM). Após 13 dias, as células foram fixadas com metanol 96% por 2 minutos e coradas com Giemsa por 2 minutos. As colônias contendo >50 células marcadas positivamente foram determinadas pela contagem (Malaval et al., 2008).

4.10 Ensaio de Atividade das MMPs – Zimografia

As células foram plaqueadas ($1,1 \times 10^4$ células/cm²) e cultivadas por 7, 14, 21 e 28 dias. O meio condicionado foi coletado e o volume de cada amostra para a corrida eletroforética foi baseado na quantificação protéica total lida em leitor de placa, segundo a técnica de Bradford. Com a quantidade de proteína estabelecida, foram feitos os cálculos de volume para que cada poço do gel contivesse a mesma quantidade de proteína.

Para o controle positivo foi utilizado pro-enzimas recombinantes de células CHO, de humanos. A MMP-2 (PF037, Calbiochem) foi ativada com a solução de APMA (p-aminophenylmercuric acetate) na concentração de 1mM por 2 horas, a 37°C. Para a MMP-9 (PF038, Calbiochem) foi utilizado a solução de APMA (p-aminophenylmercuric acetate) na concentração de 1mM por 20 horas, a 37°C, de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%. O gel foi incubado por 30 minutos no tampão I (50 mM Tris HCl, 2,5% Tween 80, 0,02% NaN₃), 30 minutos no tampão II (50 mM Tris HCl, 2,5% Tween 80, 0,02% NaN₃, 1 uM ZnCl₂, 5mM CaCl₂) e 18 horas sob agitação no tampão III (50mM Tris HCl, 5mM CaCl₂, 1 uM ZnCl₂, 0,02% NaN₃).

Em seguida o gel foi corado por 30 minutos com Coomassie Brilliant Blue R250 e duas vezes por 30 minutos na solução descorante. As gelatinases foram visualizadas pela capacidade de digerir o substrato formando bandas claras que contrastam com o restante do gel, onde o substrato está intacto e fortemente corado de azul (STETLER-STEVENSON et al., 1988). Ao final do processo, o gel foi armazenado em água deionizada para posterior análise. A densitometria foi feita com o auxílio do programa Scion Image.

4.11 Análise estatística dos dados

Os dados foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão dos resultados obtidos para cada grupo de tratamento e para cada período estudado. Para as análises de capacidade de biomineralização por osteoblastos isolados de calvária, FAL, CFU-F e CFU-O foi utilizado o teste estatístico ANOVA e pós teste de Tukey. Para as análises de zimografia, foi utilizado o teste ANOVA e pós teste de Dunnett.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5 (PRISM software, GraphPad). Valores de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ foram considerados significantes.

5 Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Aspectos Morfológicos dos osteoblastos obtidos da calvária

A população de células da calvária de camundongos exibe morfologia diversificada, que durante a fase de proliferação, vão desde células alongadas a poligonais (fig. 3a), atingindo confluência em cerca de 5-7 dias (fig. 3b). Após a suplementação do meio de cultura com o ácido ascórbico e o β -glicerofosfato, é possível visualizar regiões com nódulos osteóides não mineralizados, onde a célula mais diferenciada reside na zona central, seguida por uma zona intermediária e células menos diferenciadas na periferia da colônia. Após 28 dias os nódulos se expandem e há a mineralização da matriz extracelular (fig.3c, d).

Figura 3: Crescimento e morfologia de células obtidas da calvária de camundongos recém-nascidos. Fotomicrografia da população de células plaqueadas na densidade de 7×10^3

células/cm² após 24h (A); população de células semi-confluentes formando uma monocamada com células que exibem morfologia semelhante a fibroblasto (seta) e poligonais (B); estágio de multicamada do nódulo e com deposição da matriz mineral visualizada como área escura na região central do nódulo, corado com von Kossa (C) e detalhe das células coradas com von Kossa (D). Barra: 50µM.

5.2 Efeitos da indução osteogênica em osteoblastos da calvária

Para avaliar a influência do NaF durante a biomineralização destes osteoblastos, examinou-se a capacidade de mineralização e a atividade da fosfatase alcalina (FAL). As células foram estimuladas com diversas doses (0, 5, 10, 25, 59 e 75 µM) por 7, 14, 21 e 28 dias.

Após 28 dias, o teste de mineralização mostrou que as culturas de osteoblastos dos camundongos C3 produziram uma maior área de nódulos mineralizados quando comparados com B6 (fig. 4, 5).

A exposição ao NaF, provocou a redução da área mineralizada em ambas culturas, porém B6 mostrou-se mais suscetível ao NaF quando comparado com C3 (Fig 4).

O gráfico 5 descreve a área mineralizada (em %) do efeito das diversas doses de NaF nestas células. A capacidade de mineralização de C3 foi reduzida nas doses de 50 µM ($p<0,05$) e 75 µM ($p<0,01$) quando comparadas ao controle. Em relação aos osteoblastos de B6, a redução da área mineralizada já é observada desde a dose de 10 µM ($p<0,01$) e nas doses seguintes de 25, 50 e 75 µM ($p<0,001$).

Figura 4: Capacidade de biomineralização por osteoblastos isolados da calvária de camundongos recém-nascidos C3 e B6. A mineralização foi destacada pela coloração de Von Kossa. $1,12 \times 10^5$ células/cm² foram cultivadas por 28 dias em alpha-MEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos, 50 μ g/ml de ácido ascórbico 2-fosfato e 10mmol/l de β -glicerolfosfato.

Figura 5: Porcentagem de área mineralizada de C3 e B6. Média±DP do número de colônias formadas. C3: Controle= 74,75±7,64; 5µM=61,72±21,27; 10µM=66,49±16,64; 25µM=63,13±5,31; 50µM=34,79±3,40 e 75µM=28,73±3,63 e B6: Controle= 35,09±12,8; 5µM=19,87±7,02; 10µM=15,92±6,25; 25µM=7,62±4,27; 50µM=5,75±1,25 e 75µM=7,27±1,41. A área de nódulos mineralizados em cada cultura foi analisada com o auxílio do software Image-ProPlus versão 4.5 e apresentado como total da área mineralizada em relação á área total da placa (em %). Os dados foram obtidos a partir da análise de cinco experimentos independentes. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (ANOVA e teste de Tukey com nível de significância de 5%).

O ensaio de atividade da FAL foi determinado pela unidade enzimática e normalizada pela quantidade de proteína.

Para normalizar as amostras, a proteína foi dosada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando a curva padrão de BSA. A figura 6 demonstra um exemplo de curva padrão de BSA. A partir da absorbância lida a 595nm, pode-se calcular a quantidade total de proteína.

No início do processo de biomineralização C3 apresentou níveis basais da atividade da FAL na ordem de $35,54 \pm 12,26$ U/mg de proteína (controle), enquanto que em B6, esses níveis foram menores ($14,7 \pm 3,17$ U/mg de proteína). À medida que o processo de biomineralização avança, a partir de 14 e 21 dias, pode-se observar o pico de atividade desta enzima para os grupos controles ($125,33 \pm 8,50$ e $248,41 \pm 30,65$ U/mg de proteína, respectivamente) para C3, e para B6 ($82,8 \pm 50,7$ e $113,89 \pm 28,02$). No vigésimo oitavo dia, essa atividade diminui, mas não atinge os níveis basais encontrados no início do processo ($94,94 \pm 37,17$ para C3 e $77,84 \pm 28,34$ para B6) (figura 7).

Apesar dessas diferenças entre os períodos avaliados tanto de C3 quanto em B6, não foi verificada diferenças significativas entre as diversas doses de NaF utilizadas neste trabalho (figura 7).

Figura 6: Curva Padrão de BSA.

Atividade da Fosfatase Alcalina - C3

Atividade da Fosfatase Alcalina - B6

Figura 7: Caracterização bioquímica dos osteoblastos de C3 e B6. A atividade da FAL em osteoblastos isolados de calvária foi determinada pela atividade enzimática. A unidade enzimática foi obtida com o p-nitrofenilfosfato como substrato por 30 minutos a 37°C e leitura da absorbância em 410nm. Os resultados foram expressos como atividade específica (nmol de p-nitrofenol/mg de proteína). A atividade da FAL foi medida após 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo em MO. Cada barra indica a Média $\pm$ DP de três experimentos independentes. (ANOVA e teste de Tukey com nível de significância de 5%). Os dados foram obtidos a partir da análise de três experimentos independentes.

5.3 Ensaio de unidades formadoras de colônias

Para determinar se o NaF altera a frequência de osteoprogenitores, o ensaio de unidade formadora de colônias de fibroblastos (*CFU-F: colony forming unit-Fibroblast*), das células provenientes da medula do fêmur e tíbia foram tratados com 0, 5, 10, 25, 50 e 75 μM de NaF por 13 dias e coradas com Giemsa. Resultados com B6, indicam que o aumento do número de colônias com a exposição ao NaF, apenas na dose de 25 μM ($p < 0,05$) (figura 8).

(A)

(B)

Figura 8: Ensaio de unidade formadora de colônias-fibroblasto, de células da medula de fêmur e tíbia dos camundongos B6. (A) 5×10^5 células/poço de C3 e 5×10^5 células/poço cultivados em DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos por 13 dias e coradas com Giemsa; (B)

Média $\pm$ DP de dois experimentos independentes: Controle= 30,33 $\pm$ 3,06; 5 μ M=33,67 $\pm$ 2,52; 10 μ M=40,33 $\pm$ 1,53; 25 μ M=44,00 $\pm$ 3,61; 50 μ M=31,33 $\pm$ 6,03 e 75 μ M =32,33 $\pm$ 7,64. Foram consideradas apenas as colônias com $\geq$ 50 células. Os dados foram obtidos a partir da análise de três experimentos independentes.

No intuito de responder se o NaF possui a capacidade de estimular a diferenciação de células oriundas da medula de fêmur e tíbia desses animais, foi realizado o ensaio de unidade formadora de colônias de osteoblastos (*CFU-O: colony forming unit-Osteoblast*). Este ensaio demonstra o potencial de células capazes de formar nódulo mineralizados.

O gráfico 9 apresenta o número de nódulos mineralizados identificados no ensaio de CFU-O de cada espécie de camundongo. Em células de medula de B6, o NaF foi capaz de aumentar significativamente o número de colônias mineralizadas nas doses de 10 e 25 μ M ($p<0,05$) (fig 9b). Em relação a C3, apenas a dose de 10 μ M de NaF foi estatisticamente efetiva ($p<0,05$) (fig 9a).

(A)

(B)

Figura 9: Ensaio de unidade formadora de colônias-osteoblasto, de células da medula de fêmur e tibia dos camundongos C3 e B6. 1×10^6 células/poço de C3 e 5×10^6 células/poço de B6 foram cultivados em alpha-MEM suplementado com 15% de SFB e antibióticos e tratados com 0, 5, 10, 25, 50 e 75 μM de NaF por 21 dias e coradas com von Kossa. Foram consideradas apenas as colônias com ≥ 50 células. C3: Controle= $20,67 \pm 3,05$; $5\mu\text{M}$ = $30 \pm 3,60$; $10\mu\text{M}$ = $35 \pm 8,54$; $25\mu\text{M}$ = $25,67 \pm 7,09$; $50\mu\text{M}$ = $21,7 \pm 2,08$ e $75\mu\text{M}$ = $23,33 \pm 3,21$ e B6: Controle= $17,67 \pm 2,88$; $5\mu\text{M}$ = $22,33 \pm 6,42$; $10\mu\text{M}$ = $27,33 \pm 2,08$; $25\mu\text{M}$ = $27,67 \pm 2,51$; $50\mu\text{M}$ = $22 \pm 3,61$ e $75\mu\text{M}$ = $18,67 \pm 2,08$. Os dados foram obtidos a partir da análise de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ (ANOVA e teste de Tukey com nível de significância de 5%).

5.4 Efeitos do tratamento com NaF na atividade de MMP em osteoblastos de calvária

Apesar dos osteoblastos de B6 apresentarem inibição da mineralização a partir da dose de 10 μM , em C3 isso só foi verificado a partir da dose de 50 μM . Desta forma optou-se por utilizar a dose de 50 μM para realizar a análise da atividade das MMPs através da técnica de zimografia.

O volume de cada amostra para a corrida eletroforética foi baseado na quantificação protéica total segundo a técnica de Bradford (Bradford, 1976).

A figura 10 demonstra o padrão zimográfico encontrado nas amostras de osteoblastos provenientes da calvária para as formas não-ativas (pró-MMP) e ativas (MMP) de -2 e -9. Nestas amostras foi constatado a atividade de MMP-2, porém não foi verificada qualquer atividade de MMP-9.

Figura 10: Análise da atividade de MMP. Gel representativo da atividade de MMP demonstrado pelo ensaio de zimografia em gel de poliacrilamida 10% para amostras de meio condicionado de osteoblastos de calvária tratados com 50 µM de NaF. Pró-MMP-9: gelatinase de 92kDa que após ativação com APMA na concentração final de 1 mM. MMP-9 ativa: 82kDa; pró-MMP-2: 72kDa e MMP-2 ativa: 66kDa. C= controle, T= 50 µM de NaF.

O gráfico 11a exibe a análise de densitometria da porção pró-ativa da MMP-2, com peso molecular de 72 kDa. Verificou-se que os osteoblastos de obtidas da calvária de C3 tratados com 50 µM de NaF apresentaram uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos períodos de 14 ($0,82 \pm 0,04$) e 21 dias ($0,81 \pm 0,04$), quando comparados com o seus respectivos controles (controle considerado como 1). Porém em relação à sua porção ativa, não foi verificado alterações estatisticamente significativas (Figura 11 b).

(A)

(B)

Figura 11: Análise por densitometria das formas pró e ativada de MMP-2 de C3. O meio condicionado de osteoblastos de calvária foram tratados com 50 μ M de NaF de C3. Os géis foram analisados com o auxílio do software Scion Image e os valores dos tratamentos foram normalizados em relação ao controle (considerado como 1) e cada período foi comparado com o seu respectivo controle. Os dados foram obtidos a partir da análise de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ (ANOVA e teste de Dunnett com nível de significância de 5%).

Na figura 12 podemos constatar que em relação a B6, as duas formas pró e ativada apresentaram alterações no período de 7 dias. A forma pró-ativa (A) apresentou um aumento da atividade de MMP-2 ($1,20 \pm 0,07$), e a sua forma ativa de MMP-2 (B) também apresentou um aumento significativo no período de 7 dias ($1,36 \pm 0,18$), quando comparado com seus respectivos controles ($p < 0,05$).

(A)

(B)

Figura 12: Análise por densitometria das formas pró e ativada de MMP-2 de B6. O meio condicionado de osteoblastos de calvária foram tratados com 50 μ M de NaF de B6. Os géis foram analisados com o auxílio do software Scion Image e os valores dos tratamentos foram normalizados em relação ao controle (considerado como 1) e cada período foi comparado com

o seu respectivo controle. * $p < 0,05$ (ANOVA e teste de Dunnett com nível de significância de 5%).

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

A dualidade das respostas ao flúor apresentadas pelos dois modelos animais, C3 com alta massa óssea e B6 com baixa massa óssea indicam que a influência da ação anabólica do flúor, depende do número de alvos potenciais de inibição (quantidade de osteoprogenitores presentes na calvária, de células mesenquimais presentes na medula), da atividade intrínseca destes osteoblastos e do estágio de maturação dessas células.

Sabe-se que o pico de densidade óssea no fêmur de C3 é 53% maior que B6 (BEAMER et al, 1996), e que células da medula de fêmur de C3 apresentam mais colônias FAL positivas (DIMAlet al, 1998).

Mais importante ainda, é o fato de que a alta densidade óssea de C3 é causada exclusivamente pelo aumento da atividade do osteoblasto e não pelo aumento da proliferação dessas células (SHENG et al, 1999, 2002, 2004). Segundo Sheng et al, (2004) são os osteoblastos mais diferenciados em C3 que apresentam maior atividade na formação óssea e menor nível de apoptose. Isto pode ser interpretado como sinônimo de longevidade, o que resultaria em uma população mais madura e funcionalmente ativa de osteoblastos.

Desta forma, os resultados do ensaio de mineralização de células provenientes de calvária demonstram que estes osteoprogenitores mais diferenciados de C3, são mais resistentes à ação inibitória do flúor que os osteoprogenitores de B6. Neste estudo, também verificamos que culturas cultivadas por até 35 dias com as diversas doses de flúor em meio osteogênico, não resultaram em aumento da mineralização (dados não apresentados).

Resultados muito interessantes foram descritos por Kopp e Robey (1990). Estes autores utilizaram osteoblastos de osso trabecular de humanos obtidos com o auxílio da collagenase, (ou seja, osteoblastos mais diferenciados) tratados com diversas doses de flúor 10^{-6} a 10^{-3} M e varias concentrações de soro fetal bovino, (0; 0,5; 2; 10 e 20%). O flúor não foi capaz de alterar a incorporação de timidina tritiada em qualquer um dos tratamentos. A ausência

do efeito mitogênico foi também confirmada pela contagem celular de 13 experimentos independentes, inclusive em meios com e sem suplementação pelo soro fetal bovino.

No caso da atividade da FAL, enzima que interfere na hidrólise de pirofosfato inorgânico (um importante inibidor da mineralização), resultados semelhantes foram encontrados por Bellows et al., (1993) onde a atividade da fosfatase alcalina foi idêntica entre o controle e o tratamento com flúor durante a fase de mineralização, indicando que a FAL não é alvo do flúor em células da calvária durante o processo de mineralização.

Em relação à MMP-2, os resultados indicam seu papel importante e diferencial na mineralização das células de calvária dos camundongos B6 e C3. O aumento tanto da forma pró-ativa e principalmente da forma ativada de MMP-2 de B6 no período de 7 dias, indicam a relação entre o NaF e a organização da matriz extracelular dessas células, onde a característica marcante dessa fase, dá-se principalmente pela elevação máxima dos níveis de expressão gênica do colágeno tipo I. Isso foi demonstrado em estudos sobre o padrão de expressão sequencial e temporal de genes codificadores de marcadores de osteoblastos *in vitro* (OWEN et al., 1990; STEIN e LIAN 1993). Diante desses resultados, pode-se especular que: o NaF é capaz de causar um aumento da produção de colágeno, e o aumento da atividade de MMP-2 seria um efeito secundário em resposta a este aumento, ou o aumento da atividade desta enzima (sem alterações expressivas da produção de colágeno), causa o comprometimento da formação inicial de matriz extracelular e consequentemente, da mineralização já nas fases iniciais deste processo.

Sabe-se que o colágeno e as proteínas não colágenas são essenciais para a integridade biomecânica do osso, e diversas proteínas de matriz possuem papel importante na mineralização (OXLUND et al., 1995; BOSKEY et al., WANG et al., 2001; BURR, 2002; YOUNG, 2003), e o NaF é capaz de inibir a síntese de colágeno em osteoblastos de calvária de ratos (MIAO et al., 2002), influenciar a estrutura de proteoglicanas (WADDINGTON e LANGLEY, 1998).

Além disso, a MMP-2 está expressa de forma difusa na população de osteoblastos obtidos de migração espontânea de fragmentos de tíbia de ratos PN7, e está associada à diferenciação celular *in vitro* (FILANTI et al., 2000).

Estudos envolvendo camundongos *Knockout* de MMP-2 podem fornecer pistas importantes sobre o papel da MMP-2 no início da deposição da matriz de colágeno, pois nestes animais foi constatado a ausência de proteólise de colágeno e defeitos relacionados ao crescimento e apoptose de osteoblastos (INOUE et al., 2006).

No caso de C3, as alterações na atividade de MMP-2 demonstram a influência do NaF na fase mais tardia da mineralização, ou seja, na fase relacionada à maturação desta matriz extracelular. A redução da MMP-2 nos períodos de 14 e 21 dias indicam que neste modelo experimental, pode haver deficiência na degradação desta matriz extracelular. Este desequilíbrio entre o conteúdo mineral e orgânico poderia dificultar e/ou impedir a deposição de matriz mineralizada.

Seguindo na direção oposta, os resultados de Manduca et al., (2005) podem fornecer pistas para esclarecer em parte, os resultados obtidos neste trabalho. Estes autores relataram que o tratamento como FMS*Calciumfluor aumentou a mineralização dos osteoblastos e constataram também o aumento na expressão gênica de MMP-2 após 14 dias, corroborando a participação desta enzima no processo de biomineralização.

Segundo Owen et al., (1990) inicialmente há o período de proliferação ativa durante o qual os genes relacionados ao crescimento celular são altamente expressos. Em seguida, ocorre a redução da proliferação, e um período de maturação da matriz, onde o gene da FAL apresenta seu auge de expressão e, finalmente segue-se o terceiro período desta sequência onde a matriz extracelular encontra-se preparada para a mineralização.

Há evidências para a existência de duas importantes transições entre esses três períodos de desenvolvimento, representando os pontos de restrição no processo de diferenciação celular. A primeira transição ocorre com o final do período proliferativo, e a segunda é alcançada quando a expressão de genes como a osteocalcina e osteopontina torna-se significativamente elevadas com o

início da mineralização. O período proliferativo é necessário para a expressão do gene do colágeno, sendo que a produção da matriz de colágeno dá suporte à maturação do fenótipo osteoblástico, e existe também, uma relação recíproca e funcional entre a redução da proliferação e o início da expressão de marcadores característicos do fenótipo osteoblástico, tal com a FAL e a osteopontina.

Desta forma, pode-se estabelecer a hipótese de que as alterações observadas neste trabalho em relação à expressão da MMP-2 dos osteoblastos de C3 e B6 estão distintamente acopladas a estes diferentes pontos de restrição.

O flúor tem sido utilizado por diversos grupos e com desenho experimental heterogêneo, na forma de diferentes complexos (fluoreto de alumínio, fluoroaluminato, MFP, Calciumfluor), e pode ser administrado conjuntamente com outros elementos (cálcio, vitamina D, drogas inibidoras de reabsorção, etc). Além disso, a ampla gama de doses utilizada nos trabalhos, a duração do período de exposição e sua ação de acordo com a região do esqueleto e o estado de diferenciação celular, contribuem para aumentar a controvérsia em torno desta questão.

Em contraste com a maioria das drogas inibidoras da reabsorção óssea utilizadas na prevenção e tratamento da osteoporose (como por exemplo, o alendronato), o flúor foi utilizado em humanos para estimular a atividade do osteoblasto. Aumenta a densidade mineral óssea, e este fato tem sido relatado em revisões sistemáticas, de diversos testes randomizados e controlados (HAGUENAUER et al., 2000; EPSTEIN, 2006; VESTERGAARD et al., 2008)

Porém, estudos de histomorfometria sugerem que apesar deste aumento da densidade mineral óssea, da mesma forma, existe um decréscimo correspondente na elasticidade e resistência (AARON e KANIS, 1991) e aumento da estrutura cristalina do tecido ósseo (ERIKSEN et al., 1985). Apesar do flúor ser capaz de aumentar a densidade mineral da coluna lombar, isto não resulta na redução de fraturas vertebrais. O aumento da dose de flúor, provoca o aumento ainda maior do risco de fraturas em regiões do esqueleto (distintas da vértebra) (RIGGS et al., 1990), além dos efeitos colaterais gastrointestinais,

sem melhora no índice de fratura vertebral. Há outros estudos que indicam um aumento da dor periauricular devido a fraturas por estresse (SCHINTZLER et al., 1985).

Diversas explicações têm sido propostas para estes resultados contraditórios. Acredita-se que a ausência do efeito anti-fraturas do flúor é dado pelo aumento da espessura do osso sem incremento na qualidade deste osso (AARON e KANIS, 1991). Em alguns testes clínicos, a baixa dosagem de flúor produziu uma nova formação óssea, porém pouco densa, devido a alterações na orientação das fibras de colágeno e mineralização defeituosa, além do acúmulo do flúor em microfraturas de calos, prejudicando a restauração do tecido (RIGGS et al., 1990; KLEEREKOPER e BALENA 1991; CASS et al., 1966; KANIS e MEUNIER, 1984 e BOIVIN et al., 1991).

Aspectos clínicos antagônicos também são características da fluorose, onde inicialmente os pacientes passam por uma fase de hipomineralização, para no estágio seguinte, apresentar calcificação dos ligamentos e hipermineralização do esqueleto.

Os resultados obtidos neste trabalho tentam organizar em parte, o paradoxal quadro descrito acima. Como as mesmas doses de flúor aplicadas ao mesmo modelo experimental resultaram em diferentes graus de mineralização?

Sabe-se que durante a diferenciação e deposição da matriz mineralizada pelos osteoblastos, a partir de células mesenquimais, ocorre uma complexa e coordenada ação espacial e temporal entre diversos fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, envolvendo a regulação e interação entre diferentes moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição.

Desta forma, a auto-renovação das células mesenquimais depende de moléculas promotoras deste evento como o EGF, da expressão de genes como o Sca-1/Ly-6A (antígeno 1 de célula tronco) e de OSF-1 (fator de estimulação de osteoblasto) cuja propriedade quimiostática estimula a atividade do osteoblasto diferenciado. Outros fatores como o hormônio paratireóide, hormônio do crescimento, prostaglandinas e IGF-1 exibem efeitos mais penetrantes, afetando a renovação celular e estimulando a diferenciação

osteogenica das populações BMP positivas (DATTA et al., 2008). Algumas das principais moléculas envolvidas no desenvolvimento do esqueleto pertencem à via de sinalização de Wnt e TGF- β /BMP, que promovem a expressão de Runx2, um fator de diferenciação chave necessário para a diferenciação das células mesenquimais (DATTA et al., 2008; PROFF e ROMER, 2009).

Essas moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição podem ser direta e/ou indiretamente moduladas pelo flúor, através da inibição da tirosina fosfatase, cujo papel central na via de transdução de sinal de diversas moléculas envolvidas no processo de diferenciação celular, pode levar a um quadro aberrante e participar na etiologia de diversas doenças (BURKE et al., 2001).

Desta forma, como cada estágio de diferenciação celular pode ser caracterizado pelo conjunto de diferentes elementos da via de sinalização celular, o efeito do flúor em osteoprogenitores provenientes da calvária e células mesenquimais da medula óssea de fêmur e tíbia dos mesmos animais (como demonstrado no teste de CFU-O), apresentaram potencial de mineralização opostos. Além disso, o flúor foi capaz de aumentar inclusive o numero de células mesenquimais no ensaio de CFU-F, reforçando o estímulo positivo do flúor nessas células.

Relatos semelhantes foram descritos em trabalhos relatarem que o flúor foi capaz de alterar a mineralização óssea, aumentando a atividade da FAL, efeito estimulatório na produção de osteocalcina em osteoblastos de humanos (KASSEM *et al.*, 1994 e KHOKER e DANDONA, 1990) na qual foram utilizados células mesenquimais da medula óssea. Já os estudos de Palermo *et al* (1999) e Manduca *et al* (2005) que utilizaram osteoblastos a partir de fragmentos de tíbia de ratos em idade pos natal de 7 dias, o flúor foi complexado com o cálcio, na preparação chamada de FMS*Calciumfluor.

Em relação à utilização do flúor no tratamento da osteoporose, um trabalho merece destaque. Balena e colaboradores (1998) citaram em sua revisão, um estudo de histomorfometria, no qual pacientes idosos que receberam uma alta dose da NaF (80-120mg/dia) obtiveram um grande aumento progressivo na extensão da superfície coberta pelos osteoblastos

após 10 semanas de tratamento, apresentando um pico em 40 semanas e que por volta da 85ª semana este índice retornou aos níveis da 10ª semana. Curiosamente, na sequência do tratamento, a qual utilizou-se uma dose menor (50mg/dia) além de ser combinado com vitamina D, o mesmo grupo apresentou uma redução desses níveis com subsequente normalização após 3 anos de tratamento e estabilização por mais 2 anos.

A rapidez e a magnitude desta resposta a alta dose de flúor pode ser apenas explicada pela transformação direta de células quiescentes, as células de revestimento, que ou diferenciam-se em osteoblastos ou foram substituídas por novos osteoblastos, alterando a sequência normal de remodelamento ósseo (BALENA et al., 1998). As células de revestimento recobrem as superfícies ósseas quiescentes, formando uma camada contínua de células interconectadas capaz de manter a homeostase. Cobrem mais que 80% das superfícies do endóstio dos ossos trabeculares. Possuem dois papéis importantes: como uma membrana biológica, regulando a troca de substratos entre o fluido e o compartimento ósseo e o fluido extracelular da medula óssea e como receptor mecânico da na conexão da rede de osteócitos e a população de osteoclastos para indução local da reabsorção óssea (DIERKES et al., 2009).

De tal modo, a osteomalácia causada pela administração do flúor tem sido classificada como aposicional, devido à adição de osteóide nas superfícies dos ossos já existentes e ao aumento do volume de osso mineralizado, e isto é distinto da osteomalácia causada pela carência de vitamina D, que é classificada como de substituição, em que o osso é substituído pela formação osteóide, e dessa forma há a redução do volume de osso mineralizado (SCHERK et al., 1980).

Cabe aqui destacar que, além dos efeitos biológicos do flúor em osteoblastos, a ação do flúor também parece ser mediada em outros níveis. O flúor pode interagir com a matriz mineral óssea de forma físico-química (GRYNPAS, 1990 PAK et al., 1995), levando a conversão de hidroxiapatita em fluoroapatita. Isto altera a conformação do cristal, e consequentemente a alterações das propriedades de resistência mecânica (MOUSNY et al., 2008).

Os dados aqui apresentados, destacam ainda mais o papel do NaF na regulação de múltiplos passos durante a progressão osteogênica *in vitro*. A ação bifásica do NaF na diferenciação celular de células mesenquimais e osteoprogenitores, além das diferenças encontradas entre os osteoblastos das duas espécies de camundongos, mostra que é cada vez mais evidente que a base molecular para o desenvolvimento seletivo da resposta à exposição ao NaF, dá-se através da ativação de múltiplos genes durante todo o processo de diferenciação celular e está acoplado a carga genética de cada indivíduo.

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

- 1) A exposição ao NaF diminui a mineralização por osteoblastos obtidos da calvária de camundongos recém-nascidos, sendo B6 o mais suscetível quando comparado ao C3, porém não foi verificada alteração da atividade enzimática da fosfatase alcalina nas doses testadas neste trabalho;
- 2) O NaF é capaz de estimular positivamente as células mesenquimais oriundas da medula de fêmur e tíbia, aumentando a frequência de osteoprogenitores e induzindo a mineralização dessas células;
- 3) Osteoprogenitores/osteoblastos mais diferenciados são mais resistentes à influência do flúor;
- 4) A atividade da MMP-2 está alterada de forma distinta nos osteoblastos de B6 e C3, e é acoplada a diferentes pontos de restrição;
- 5) Os camundongos C3 e B6 podem ser importantes e particularmente úteis nos estudos de biologia óssea que envolvem a ação do flúor na mineralização por osteoblastos.

Referências

REFERÊNCIAS

- Aaron, JE e Kanis, VC. The effect of sodium fluoride on trabecular architecture. *Bone*. 1991; (12): 307-10.
- Aloia, JF; Vaswani, A; Mikhail, M; Badshah, M e Flaster, E. Cancellous bone of the spine is greater in black women. *Calcif Tissue Int*. 1999; (65): 29-33.
- Asahina, I; Sampath, TK e Hauschka, PV. Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp Cell Res*. 222, 1996; (3) 38–47.
- Aoba, T. The effect of fluoride on apatite structure and growth. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997; (8): 136-153.
- Aznar, S e Lacal, JC. Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Letters*. 2001; (165): 10-19.
- Balena R, Kleerekoper M, Foldes JA, Shih MS, Rao DS, Schober HC, Parfitt AM. Effects of different regimens of sodium fluoride treatment for osteoporosis on the structure, remodeling and mineralization of bone. *Osteoporos Int*. 1998; (8):428–435.
- Battmann, A; Resch, H; Libanati, CR; Ludy, D; Fischer, M; Farley, S e Baylink, DJ. Serum fluoride and serum osteocalcin levels in response to a novel sustained-release monofluorophosphate preparation: comparison with plain monofluorophosphate. *Osteoporosis Int*. 1997; (7): 48-5.
- Beamer, WG ; Donahue, LR; Rosen, CJ e Baylink, DJ. Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone*. 1996; (18): 397-403,.
- Bellows, CG; Heersche, JN e Aubin, JE. The effects of fluoride on osteoblast progenitors in vitro. *J Bone Miner Res*. 1990; 5(Suppl. 1):S101–S105.

Bellows, CG; Aubin, JE, Heersche, JNM e Antosa, ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria populations. *Calcif Tissue Int.* 1986; (38): 143-154.

Bellows, CG; Aubin, JE e Heersche, JNM. Differential effects of fluoride during initiation and progression of mineralization of osteoid nodules formed in vitro. *J Bone Miner Res.* 1993; (8): 1357-1363.

Bhargava, U; Bar-Lev, M; Bellows, CG e Aubin, JE. Ultrastructural analysis of bone nodules formed in vitro by isolated fetal rat calvarial cells. *Bone.* 1988; (9): 155-163.

Birkedal-Hansen, H; Moore, WG; Bodden, MK; Windsor, LJ; Birkedal-Hansen, B; DeCarlo, A, Engler, JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; (4): 197-250.

Blair, HC; Robinson, LJ e Zaidi, M. Osteoclast signalling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; (328): 728–738.

Boettner, B e Van Aelst, L. The role of Rho GTPases in disease development. *Gene.* 2002; 286(2):155-74.

Bohannon, A. D. Osteoporosis and African American women. *J Women's Health Gend Based Med.* 1999; (8): 609-615.

Boivin, G; Grousseau, B e Mournier, PJ. X-ray microanalysis of fluoride distribution in microfracture calluses in cancellous iliac bone from osteoporotic patients treated with fluoride and untreated. *J Bone Miner Res.* 1991; (6): 1183-90.

Bogarti, P; Martelli, AM; Bellacosa, A; Castro, R; Massari, L; Capitani, S e Neri, LM. Translocation of Akt/PKB to the nucleus of osteoblast-like MC2T3-E1 cells exposed to proliferative growth factors. *FEBS letters.* 2000; (477): 27-32.

Bonnick, SL e Shulman, L. Monitoring Osteoporosis Therapy: bone mineral density, bone turnover markers, or both? *The American Journal of Medicine*. 2006; (119): 4A, 25S-31S.

Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; (7):72:248-54.

Boskey AL, Wright TM, Blank RD. Collagen and bone strength. *J Bone and Miner Res*. 1999; (14):330–5.

Briancon, D e Meunier, PJ. Treatment of osteoporosis with fluoride, calcium, and vitamin D. *Ortop Clin North Am*. 1981; (12): 629-648.

Bruyere, O; Collete, C; Delmas, P; Rouillon, A; Roux, C; Seidel, L; Richy, F e Reginster, J. Interest of biochemical markers of bone turnover for long-term prediction of new vertebral fracture in postmenopausal osteoporotic women. *Maturitas*. 2003; (44): 259-265.

Burke TR; Yao, Z; Liui, D; Voigt, J e Gao, Y. Phosphoryltyrosyl minetics in the design of peptide-based signal transduction inhibitors. *Biopolymers*. 2001; (60): 32-44.

Burr DB. The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone*. 2002; (31):8–11.

Cao, J; Zhao, Y; Liu, J; Xirao, R; Danzeng, S; Daji, D e Yan, Y. Bick tea fluoride as a mainsource of adult fluorosis. *Food and Chem Tox*. 2003; (41): 535-542,.

Carvalho, JG; Cestari, TM; de Oliveira, RC e Buzalaf, MAR. Fluoride effects on ectopic boné formation in Young and old rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2008; (30): 287-294.

Caverzasio, J; Palmer, G e Bonjour, JP. Fluoride: Mode of action. *Bone*. 1998; (22): 6, 585-589.

Chaurhary, LR e Hruska, KA. The cell survival signal Akt is differentially activated by PDGF-BB, EGF, and FGF-2 in osteoblastic Cells. *J Cell Biochem.* 2001; (81): 304-311.

Cho, TJ; Gerstenfeld, LC e Einhorn, TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor- β superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2002; (17): 513-20.

Charles P, Mosekilde L, Jensen FT. The effects of sodium fluoride, calcium phosphate, and vitamin D2 for one to two years on calcium and phosphorus metabolism in postmenopausal women with spinal crush fracture osteoporosis. *Bone.* 1985; (6):201–206.

Colnot, C; Thompson, Z; Micalau, T; Werb, Z e Helms, JA. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development.* 2003; (130): 4123-4133.

Cummings, SR; Black, DM; Nevitt, MC; Browner, W; Cauley, J; Ensrud, K; Genant, HK; Palerm, L, Scott, J e Vogt, TM. Bone density at various sites for prediction of hip fractures. *Lancet.* 1993; (341): 72-75.

Cundy T. Recovery from skeletal fluorosis. *J Bone Miner Res.* 2007; (22):1475.

Datta, HK; Ng, WF; Walker, JÁ; Tuck, SP e Varanasi, SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* 2008; (61): 577-587.

Duprez, D; Bell, EJ; Richardson, MK; Archer, CW; Wolpert, L e Brickell, PM. Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mech Dev.* 1996; (57): 145-57.

Edgar, CM; Chakravarthy, V; Barnes, G; Kakar, S; Gerstenfeld, LC e Einhorn, TA. Autogenous regulation of a network of bone morphogenetic proteins (BMPs) mediates the osteogenic differentiation in murine marrow stromal cells. *Bone.* 2007; (40): 1389-1398.

Egeblad, M e Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Rev Cancer*. 2002; (2): 161-174.

Escarot-Charrier, B; Glorieux, FH; van der Rest, M e Pereira, G. Osteoblast isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol*. 1983; (96): 639-643.

Eriksen, EF; Mosekilde, L e Melsen F. Effect of sodium fluoride, calcium, phosphate and vitamin D2 on trabecular bone balance and remodeling in osteoporotics. *Bone*. 1985; (6):381–389.

Everett, ET. Fluoride's effects on the formation of the teeth and bones, and the influence of genetics. *J Dent Res*. 2010: 1-9.

Fallon MD, Whyte MP, Teitelbaum SL. Stereospecific inhibition of alkaline phosphatase by L-tetramisole prevents in vitro cartilage calcification. *Lab Invest*. 1980; (43): 489-94.

Fratzl, P; Roschger, P; Eschberger, J; Abendroth, B e Klaushofer, K. Abnormal bone mineralization after fluoride treatment in osteoporosis: a small-angle X-ray-Scattering study. *J Bone Miner Res*. 1994; (9): 1541-9.

Frost, HM. Why should many skeletal scientists and clinicians learn the Utah paradigm of skeletal physiology? *J.Musculoskelet. Neuronal Interact*. 2001; (2): 121–130.

Garnero, P e Delmas, PD. Contribution of bone mineral density and bone turnover markers to the estimation of risk of osteoporotic fracture in postmenopausal women. *J. Musculoskel Neuron Interact*. 2004; (4): 50-63.

Gille, H; Sharrocks, AD e Shaw, PE. Phosphorylation of transcription factor p62^{TCF} by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature*. 1992; (358): 414-416.

Gordeski G.I: Impact of the menopause on the epidemiology and risk factors of coronary artery heart disease in women. *Exp Gerontol*. 1994; (29): 357-375.

Grey, A; Chen, Q; Xu, X; Callon, K e Cornish, J. Parallel phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways subserve the mitogenic and antiapoptotic actions of insulin-like growth factor I in osteoblastic cells. *Endocrinology*. 2003; (144): 4886-4893.

Gruber HE, Baylink DJ. The effects of fluoride on bone. *Clin Orthop Relat Res*. 1991; (267):264–277.

Haguenauer D, Welch V, Shea B et al. Fluoride for the treatment of postmenopausal osteoporotic fractures: a metaanalysis. *Osteoporos Int*. 2000; (11):727–738.

Harada, S e Rodan, GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003; (423): 349–355.

Harmey D, Hessle L, Narisawa S et al. Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank: An integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am J Pathol*. 2004; (164): 1199-209.

Harrison, JE; McNeill, KG; Sturtridge, WC e Fornasier, V. Three-year changes in bone mineral mass of osteoporotic patients based on neutron activation analysis of the central third of the skeleton. *J Clin Endocrinol Metab*. 1981; (52): 751-758.

Heaney, R. P. Bone mass, the mechanostat, and ethnic differences. *J. Clin Endocrinol Metab*. 1995; (80): 2289-2290.

Hessle L, Johnson KA, Anderson HC et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; (99): 9445-9.

Hileman, B. Fluoridation of water. Questions about health risks and benefits reain after more than 40 years. *Chemical & Engineering News*. 1988.

Hui, SL; Slemenda, CW, e Johnston, CC Jr. Baseline measurement of bone mass predicts fracture in white women. *Ann Intern Med*. 1989; (111): 355-36.

Holmbeck, K; Bianco, P; Caterina, J; Yamada, S; Kromer, M; Kuznetsov, SA; Mankani, M; Robey, PG; Poole, AR; Pidoux, I; Ward, JM e Birkedal-Hansen, H.. MTi-MMP deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*. 1999; (99): 81-92.

Holmbeck, K; Bianco, P; Pidoux, I; Inoue, S; Billingham, RC; Wu, W; Chrysovergis, K; Yamada, S; Birkedal-Hansen, H e Poole, AR. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone . *J Cell Sci*. 2005; (118), 147-156.

Inada, M; Wang, Y; Byrne, MH; Rahman, MU; Miyaura, C; López-Otín, C e Krane, SM. Critical roles for collagenase-3 (Mmp 13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *PNAS*. 2004; (101): 17192-17197.

Jaffe, AB e Hall, A. RHO GTPases: Biochemistry and Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005; (21), 247-69.

Johnson, JEH; Kearns, AE; Doran, PM; HKhoo, TK e Wermers, RA. Fluoride-related bone disease associated with habitual tea consumption. *Mayo Clin Proc*. 2007; 82(6), 719-724.

Joshi, S; Hlain, T; Whitford, GM e Compston, JE. Skeletal fluorosis due to excessive tea and toothpaste consumption. *Osteoporosis International*. 2010.

Kanis e Meunier. Should we use fluoride to treat osteoporosis?. A review. *QJ Med*. 1984; (53): 145-64.

Kassem, M; Mosekilde, L e Eriksen, EF. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures on human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *J Bone Miner res.* 1993; (8): 1453-1458.

Kassem, M; Mosekilde, L e Eriksen, EF. Effects of fluoride on human bone cells in vitro: differences in responsiveness between stromal osteoblast precursors and mature osteoblasts. *Eur J Endocrinol.* 1994; (30):381–386.

Kleerekoper, M; Peterson, EL; Nelson, DA; Phillips, E; Schork, MA; Tilley, BC e Parfitt, AM. A randomized trial of sodium fluoride as a treatment for postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis Int.* 1991; (1): 155-161.

Khokher, MA e Dandona, P. Fluoride stimulates ³Hthymidine incorporation and alkaline phosphatase production by human osteoblasts. *Metabolism.* 1990; (39):1118–1121.

Krishnamachari, KA. Skeletal fluorosis in humans: a review of recent progress in the understanding of the disease. *Prog Food Nutr Sci.* 1986; (10): 279-314.

Krishnamachari KAVR. Further observations on the syndrome of endemic genu valgum of South India. *Indian J Med Res.* 1976; (64): 284-291.

Kubota, K; Zhang, O; Wrana, JL; Ber, R; Aubin, IE e Butler WT. Multiple forms of SPPI (secreted phosphoprotein I osteopontin) synthesized by normal and transformed rat bone cell populations Regulation by TGF- β . *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; (162):1453- 1459.

Kurland ES, Schulman RC, Zerwekh JE, Reinus WR, Dempster DD, Whyte MP Case report. Recovery from skeletal fluorosis (an enigmatic American case). *J Bone Miner Res.* 2007; (22):163–170.

Lange-Carter, CA; Pleiman, CM; Gardner, AM; Blumer, KJ e Johnson, GL. A divergence in MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science.* 1993; (260): 315-319.

Lau, WKH e Baylink, DJ. Molecular mechanism of action of fluoride on bone cells. *J. Bone Miner Res.* 1998; (13): 1660-1667.

Levy, SM. An Update on fluorides and fluorosis. *J. Can Den Assoc.* 2003; (69): 286-291.

Lian ZH, Wu EH. Osteoporosis: an early radiographic sign of endemic fluorosis. *Skeletal Radio!.* 1986; (15):350-353.

Lyons, KM; Hogan, BL e Robertson, EJ. Colocalization of BMP7 and BMP2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mech Dev.* 1995; (50); 71-83.

Macias, D; Ganan, Y; Sampath, TK; Piedra, ME; Ros, MA e Hurle, JM. Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development.* 1997; (124): 1109–17.

Majeska RJ, Wuthier RE. Studies on matrix vesicles isolated from chick epiphyseal cartilage. Association of pyrophosphatase and ATPase activities with alkaline phosphatase. *Biochim Biophys Acta.* 1975; (391): 51-60.

Manduca, P; Marchisio, S; Astigiano, S; Zanotti, S; Galmozzi, F; Palermo, C e palmieri, D. FMS*Calciumfluor specifically increases mRNA levels and induces signaling via MAPK 42, 44 and not FAK in differentiating at osteoblasts. *Cell Biol Int.* 2005; (29): 629-673.

Marshall, D; Johnell, O e Wedel, H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ.* 1996; (312): 1254-1259.

Melton, LJ III; Atkinson, EJ; O'Fallon, WM; Wahner, HW e Riggs, BL.. Long-term fracture prediction by bone mineral assessed at different skeletal sites. *J Bone Miner Res.* 1993; (8):1227-1233.

Merz, W. The essential trace elements. *Science.* 1981; (213): 1332-8.

- Melton, LJ III; Khosla, S; Atkinson, EJ; O'Fallon, WM e Riggs, BL. Relationship of bone turnover to bone density and fractures. *J. bone Miner Res.* 1997; (12): 1083-1091.
- McKee, MD e Nanci, A. Postembedding colloidal-gold immunocytochemistry of noncollagenous extracellular matrix proteins in mineralized tissues. *Microsc Res Tech.* 1995; (31):44-62.
- Miao Q, Xu M, Liu B, You B. In vivo and in vitro study on the effect of excessive fluoride on type I collagen of rats. *J Hyg Res.* 2002; (31): 145-7,.
- Modrowski, D; Miravet, L; Feuga, M; Bannie, F e Marie, PJ. Effect of fluoride on bone and bone cells in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 1992; (7): 961-969.
- Moss DW, Eaton RH, Smith JK, Whitby LG. Association of inorganic-pyrophosphatase activity with human alkaline-phosphatase preparations. *Biochem J.* 1967; (102): 53-7.
- Owen, TA; Aronow, M; Shalhoub, V; Barone, LM; Wilming, L; Tassinari, MS; Kennedy, MB; Pockwinse, S; Lian, JB e Stein, GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cel Physiol.* 1990; (143): 420-430.
- Oxlund H, Barckman M, Ørtoft G, Andreassen TT. Reduced concentrations of collagen cross-links are associated with reduced strength of bone. *Bone.* 1995; (17):365S-71S.
- Page-McCaw, A; Ewald, AJ e Werb, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nature Reviews.* 2007; (8), 221-233.
- Pak, CYC; Sakhaee, K; Piziak, V e Reisch, JS. Slow-release sodium fluoride in the management of postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. *Ann Int med.* 1994; (120); 8, 625-632.

Palermo, C; Filanti, C; Poggi, S e Manduca, P. Osteogenesis in vitro in rat tibia-derived osteoblasts is promoted by the homeopathic preparation, FMS*Calciumfluor. *Cell Biol Int.* 1999; (23); 31-40.

Parfitt, AM. in: B.K. Hall (Ed.), *In Bone, The Osteoblast and Osteocyte*, The Telford Press, London, 351–426, 1991.

Parfitt, AM. High bone turnover is intrinsically harmful: two paths to a similar conclusion. The parfitt view. *J Bone Miner Res.* 2002; (17): 1558-1559.

Parks, WC; Wilson, CL e López-Boado, YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and Innate Immunity. *Nature Reviews.* 2004; (4): 617-629.

Peister, A; Mellad JA, Larson BL; Hall, BM, Gibson, LF e Prockop, D. Adult stem cells from bone (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood.* 2004; (103): 1662-1668.

Posner AS. The effect of fluoride on bone mineralisation. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA (eds) *Fluoride in dentistry*, 1st edn. Munksgaard, Copenhagen, 88–96, 1996.

Proof, P e Romer, P. The molecular mechanism behind bone remodeling: a review. *Clin Oral Invest*, 2009.

Qu, WJ; Zhong, DB; Wu, PF; Wang, JF e Han, B. Sodium fluoride modulates caprine osteoblast proliferation and differentiation. *J Bone Miner Res.* 2008; (26); 328-334.

Reed, BY; Zerwekh, JE; Antich, PP e Pak, CYC. Fluoride-stimulated [H^3]thymidine uptake in a human osteoblastic osteosarcoma cell line is dependent on transforming growth factor β . *J Bone Miner Res.* 1993; (8), 19-25.

Rezende LA, Ciancaglini P, Pizauro JM, Leone FA. Inorganic pyrophosphate-phosphohydrolytic activity associated with rat osseous plate alkaline phosphatase. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 1998; (44): 293-302.

Rickard, DJ; Sullivan, TA; Shenker, BJ; Leboy, PS e Kazhdan, I. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol*. 1994; (161), 218–28.

Riggs, BL; Hodgson, SF; Hoffman, DL; Kelly, PJ; Johnson, KA e Taves, DR. Treatment of primary osteoporosis with fluoride and calcium: Clinical tolerance and fracture occurrence. *J Am Med Assoc*. 1980; (243), 446-449.

Riggs, BL; Hodgson, SF; O'Fallon, WM e Melton LJ. Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 1990; (322): 802-809.

Riggs, BL, O'Fallon, WM; Lane, A; Hodgson, SF; Wahner, HM; Muhs, J, Chao, E e Melton, LJ. Clinical trial of fluoride therapy in postmenopausal osteoporotic women: Extended observations and additional analysis. *J Bone Miner Res*. 1994; (9): 265-275.

Riggs, BL e Melton, LJ III. Bone turnover matters: the raloxifene treatment paradox of dramatic decreases in vertebral fractures without commensurate increases in bone density. *J Bone Miner Res*. 2002; (17): 11-14.

Ringe, JD. Fluoride in Osteoporosis. In: *Principles of bone biology*. 2ª edição, vol.2, 2002.

Robey, PG; Fedarko, NS; Hefferan, TE; Bianco, P; Vetter, UK; Grzesik, W; Friedenstein, A; Van der Pluijm, G; Mintz, KP e Young, MF. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J. Bone Min. Res*. 1993; (8); S483–S487,.

Rodriguez JP e Rosselot, G. Sodium Fluoride induces changes on proteoglycans synthesized by avian osteoblasts in culture. *J Cell Biochem.* 2001; (83), 607-616.

Sashi, A; Kumar, M e Bhardwaj, M. Incidence of skeletal deformities in endemic fluorosis. *Tropical Doctor.* 2008; (38); 231-233.

Schnitzler CM, Solomon L. Trabecular stress fractures during fluoride therapy for osteoporosis. *Skeletal Radiol.* 1985; (14):276–279.

Shea, CM; Edgar, CM; Einhorn, TA e Gerstenfeld, LC. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem.* 2003; (90): 1112–27.

Sheng MH, Lau, KH; Beamer, WG; Baylink, DJ e Wergedal, JE. In vivo and in vitro evidence that the high osteoblastic activity in C3H/HeJ mice compared to C57BL/6J mice is intrinsic to bone cells. *Bone.* 2004; (35); 711-9.

Sheng MH, Lau, KH; Mohan, S; Baylink, DJ e Wergedal, JE. High osteoblastic activity in C3H/HeJ mice compared to C57BL/6J mice is associated with low apoptosis in C3H/HeJ osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* 2006; (78): 293-301.

Stein, GS; Lian, JB; e Owen, T.A.. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J.* 1990; (4): 3111–3123.

Stetler-Stevenson, WG; Krsuttsch, HC e Liotta, LA. The activation of human type IV Collagenase Proenzyme. *J Biol Chem.* 1988, (3): 53-1356.

Sodek, J; Ganss, B e Mckee, MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biolo Med.* 2001(3): 279-303.

Stein, GS e Lian, JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine Reviews.* 1993;(4): 424-442.

Stickens, D; Behonick DJ, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, Fosang AJ, Schorpp-Kistner M, Angel P, Werb Z. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development*, 2004; (131): 5883-5895.

Stevenson, CA e Watson, AR. Fluoride osteosclerosis. *AJR*, 1957; (78):13-18.

Sulak, P.J: The perimenopause: a critical time in a woman's life. *Int J Fertil*. 1996; (41): 85-9.

Takai, Y; Sasaki, T e Matozaki, T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. 2001(81):1.

Teotia M; Teotia, SPS e Kunvar, KB. Endemic Skeletal Fluorosis. *Arch Disease Childhood*. 1971; (46), 686-691.

Valcourt, U; Ronziere, MC; Winkler, P; Rosen, V herbage, D e Mallein-Gerin, F. Different effects of bone morphogenetic proteins 2, 4, 12 and 13 on the expression of cartilage and bone markers in the MC615 chondrocyte cell line. *Exp Cell Res*. 1999; (251): 264-74.

Waddington, RJ e Langley, MS. Structural analysis of proteoglycans synthesized by mineralizing bone cells in vitro in the presence of fluoride. *Matrix Biology*, 1998; (17), 255-268.

Wang X, Bank RA, Tekoppele JM, Agrawal CM. The role of collagen in determining bone mechanical properties. *J Orthop Res*. 2001;(19):1021-6.

Wasnich, RD; Ross, PD; Davis, JW e Vogel, JM. A comparison of single and multi-site BMC measurements for assessment of spine fracture probability. *J Nucl Med*. 1989; (30):1166-1171.

Wergedal, JE; Willian Lau, KH e baylink, DJ. Fluoride and bovine extract influence cell proliferation and phosphatase activities in human bone cell cultures. *Clin Orthop*. 1988; (223): 274-282.

-
- Whitford GM. Intake and metabolism of fluoride. *Adv Dent Res.* 1994; (8):5–14.
- Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev.* 1999; (45): 439-61.
- Whyte MP, Essmyer K, Gannon FH, Reinus WR. Skeletal fluorosis and instant tea. *Am J Med.* 2005; (118):78–82.
- Yan, D; Gurumurthy, A; Wright, M; Pfeiler, TW; Lobo, EG e Everett, ET. Genetic background influences fluoride's effects on osteoclastogenesis. *Bone.* 2007; (41), 1036-1044.
- Yan, X; Feng, C; Chen, Q; Li, W; Wang, H; Lv, L; Smith, GW e Wang, J. Effects of sodium fluoride treatment in vitro on cell proliferation, apoptosis and caspase-3 and caspase-9 mRNA expression by neonatal rat osteoblasts. *Arch Toxicol.* 2008.
- Young MF. Bone matrix proteins: their function, regulation and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2003 ; (14):535–42.
- Zhou, HE; Zhang, X e Nothnack, WB. Disruption of TIMP-1 gene product is associated with accelerated endometrial gland formation during early postnatal uterine development. *Biol Reprod.* 2004; (71), 534-539.

Anexo

ANEXO A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. N° 021/2008

Bauru, 19 de novembro de 2008.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **"Flúor no processo de mineralização por osteoblastos: uma abordagem comparativa"**, de autoria de Sandra Satiko Matsuda foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito *"ad referendum"* desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira
Docente do Departamento de Ciências Biológicas